



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDRATACE BIOKOLOIDŮ - KALORIMETRICKÁ STUDIE

HYDRATION OF BIOCOLLOIDS - CALORIMETRIC STUDY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ester Šméralová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1371/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Ester Šméralová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Hydratace biokoloidů – kalorimetrická studie

Zadání diplomové práce:

1. Seznámit se s problematikou biokoloidů a jejich hydratace.
2. Seznámit se s možností studia hydratace biokoloidů, zejména kalorimetrickými metodami
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech vybrat vhodné biokoloidy, navrhnout a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a navrhnout případný další postup.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Ester Šméralová
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této diplomové práce bylo studium hydratace vybraných biokoloidních látek, konkrétně huminových látek (huminových kyselin a fulvinových kyselin), kyseliny hyaluronové se třemi různými molekulovými hmotnostmi, chitosanu a dextranu. Interakce biokoloidů s vodou byly studovány různými metodami. Byl sledován vliv rozpustnosti, struktury, funkčních skupin v molekule na sorpční a hydratační schopnosti těchto biokoloidů. V případě hyaluronanu byl sledován také vliv molekulové hmotnosti. Výsledkem měření diferenční kompenzační kalorimetrie DSC a perfuzní kalorimetrie byly tepla hydratace, entalpie a teploty krystalizace a tání. K určení obsahu původní vlhkosti ve vzorcích byla použita termogravimetrická analýza TGA.

ABSTRACT

Presented master's thesis focuses on the study of hydration of selected biocolloid substances, specifically humic substances (humic acids and fulvic acids), hyaluronic acid with three different molecular weight, chitosan and dextran. Interaction of biocolloids with water was studied by different methods. The effect of solubility, structure, functional groups in molecule on sorption and hydration ability of these biocolloids was investigated. In the case of hyaluronan the influence of molecular weight was also study. Differential scanning calorimetry DSC and perfusion calorimetry give results of heat of hydration, enthalpies and temperature of crystallization and melting. Thermogravimetric analysis TGA was used to determine the original moisture content of the samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydratace, biokoloidy, huminové látky, chitosan, kyselina hyaluronová, dextran, perfuzní kalorimetrie, TGA, DSC

KEY WORDS

Hydration, biocolloids, humic substances, chitosan, hyaluronic acid, dextran, perfusion calorimetry, TGA, DSC

ŠMÉRALOVÁ, Ester. *Hydratace biokoloidů - kalorimetrická studie*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115211>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vykonala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mé vedoucí diplomové práce paní prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za její vedení, za čas, který mi věnovala a za všechny odborné rady. Mnohokrát děkuji Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za její trpělivost, ochotu, pomoc a také za informace, které mi předávala. Dále děkuji paní Leoně Kubíkové za ochotu při měření vzorků. Nakonec děkuji i mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 7 |
| 2 | Teoretická část | 8 |
| 2.1 | Hydratace..... | 8 |
| 2.2 | Huminové látky | 8 |
| 2.2.1 | Struktura a vlastnosti huminových látek..... | 9 |
| 2.2.2 | Huminové kyseliny | 10 |
| 2.2.3 | Využití huminových látek..... | 11 |
| 2.3 | Kyselina hyaluronová | 11 |
| 2.3.1 | Kyselina hyaluronová při fyziologickém pH a ve vodě..... | 13 |
| 2.3.2 | Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na jeho vlastnosti..... | 13 |
| 2.3.3 | Využití hyaluronanu..... | 14 |
| 2.4 | Chitosan | 14 |
| 2.4.1 | Chitosan a voda..... | 17 |
| 2.4.2 | Vlastnosti a využití chitinu a chitosanu | 17 |
| 2.5 | Dextran | 18 |
| 2.5.1 | Aplikace dextranu | 19 |
| 2.6 | Současný stav řešené problematiky | 20 |
| 2.6.1 | Huminové látky..... | 21 |
| 2.6.2 | Hyaluronan..... | 21 |
| 2.6.3 | Chitosan | 22 |
| 2.6.4 | Dextran..... | 24 |
| 3 | Experimentální část..... | 26 |
| 3.1 | Použité biokoloidy | 26 |
| 3.2 | Použité přístroje | 26 |
| 3.3 | Metody studia | 26 |
| 3.3.1 | Metoda perfuzní kalorimetrie | 27 |
| 3.3.2 | Termogravimetrická analýza TGA | 28 |
| 3.3.3 | Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC..... | 28 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 30 |
| 4.1 | Perfuzní kalorimetrie | 30 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.2 | Termogravimetrická analýza TGA | 35 |
| 4.3 | Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC..... | 36 |
| 5 | Závěr | 41 |
| 6 | seznam použitých zdrojů..... | 42 |
| 7 | Seznam použitých zkratek..... | 48 |
| 8 | Přílohy | 49 |

1 ÚVOD

Hydratace je jedním z nejdůležitějších faktorů hrající roli v biologické funkci molekul. Specifické interakce mezi vodou a polymerem hrají klíčovou roli jeho makroskopických vlastností. Molekuly vody většinou interagují s hydrofilními skupinami, jako jsou například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny. Vazba vody na tyto skupiny obvykle vede k tvorbě trojrozměrné sítě vodíkových vazeb, ve které se mohou spoje neustále přerušovat a znovu tvořit.

Cílem této práce bylo studium hydratačních vlastností vybraných biokoloidních látek – huminových látek (huminových kyselin a fulvinových kyselin), kyseliny hyaluronové se třemi různými molekulovými hmotnostmi, chitosanu a dextranu. Všechny tyto látky nacházejí široké uplatnění v mnoha oblastech, přičemž jejich hydratační vlastnosti hrají v mnoha jejich aplikacích velice důležitou roli.

V experimentální části byly ke studiu hydratace vybrány metody diferenční kompenzační kalorimetrie DSC a perfuzní kalorimetrie. Tyto dvě metody dávají informace o sorpčních vlastnostech jednotlivých látek v závislosti na jejich rozpustnosti, struktuře, funkčních skupinách v molekule a v případě hyaluronanu ukazují vliv molekulové hmotnosti. Při studiu hydratace s použitím metody perfuzní kalorimetrie bylo využito dvou způsobů přívodu vlhkosti, kdy tyto dva způsoby byly vzájemně srovnány. Metodou DSC byl vyhodnocován vliv vody na biokoloidní látky po 24hodinovém působení na jejich strukturu. Původní vlhkost všech vzorků byla určena termogravimetrickou analýzou TGA. Hlavním cílem práce bylo provést experimenty, zhodnotit a diskutovat výsledky a pokusit se metody dále optimalizovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydratace

Hydratace je jedním z nejdůležitějších faktorů hrající roli v biologické funkci molekul. Voda je důležité médium pro transport živit, pro membránové procesy, vyvolává biologicky aktivní konformace molekul atd. Vzhledem k jedinečným vlastnostem a silné afinitě molekul vody držet pohromadě pomocí vodíkových můstků tvoří různé struktury mající různé fyzikálně-chemické vlastnosti [1].

Různé biopolymery s hydrofilními skupinami, jako jsou například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny, mají buď silné, nebo slabé interakce s vodou [2]. Vazba vody na tyto skupiny obvykle vede k tvorbě trojrozměrné sítě vodíkových vazeb, ve které se mohou spoje neustále přerušovat a znovu tvořit. Jedna molekula vody může tvořit až čtyři vodíkové vazby. Sít' vodíkových vazeb sorbované vody ovlivňují jak chemické složení, tak struktura polymerů. Kromě toho, voda sorbovaná ve struktuře se svojí strukturou a dynamikou od klasické vody zcela liší [3]. Proto je zřejmé, že specifické interakce mezi vodou a polymerem hrají klíčovou roli jeho makroskopických vlastností. Voda navíc zprostředkovává interakce mezi biomolekulami a je tedy zásadní pro molekulární rozpoznávání a pro biologické funkce [4].

Pokud se nachází polymer v přebytku vody, může docházet k tomu, že začne botnat a může vykazovat výrazné změny v jeho mechanických a chemických vlastnostech [2]. Po absorpci vody, mohou být malé nebo méně dokonalé krystaly polymeru zničeny. S obsahem vody v polymerních materiálech také dochází k tomu, že prudce klesá teplota skelného přechodu. Pro příklad změny vlastností může být uvedeno například to, že u biopolymerních filmů dochází k tomu, že se po sorpci molekul vody film stává více propustným pro plyny a dále vlhkost umožní segmentům polymerních řetězců jejich mobilitu [5].

Je tedy známo, že interakce mezi řetězcí biopolymeru a molekulami vody jsou velmi důležité a určují strukturu a vlastností biopolymerů [6].

2.2 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny, které jsou biogenní, amorfní, koloidní a polydisperzní. Vznikají humifikací během procesu rozkladu biomolekul mrtvých rostlin a živočichů a také působením mikroorganismů [7]. Přirozeně se vyskytují zejména v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a v některých dalších materiálech. Huminové látky se v přírodě nachází ve stopovém množství v pískách a v jílech, v jednotkách procent v běžných zeminách, v desítkách procent jsou HL zastoupeny v hnědém uhlí a v lignitu a až z 80 hm. % tvoří rašelinu [8]. Tekoucí povrchové a podzemní vody jsou zodpovědné za jejich distribuci po celé hydrosféře a litosféře. Tvoří 40 až 70 hm. % rozpuštěné organické hmoty v řekách a v potocích. HL podporují růst rostlin, stabilizují půdní strukturu a chrání životní prostředí proti znečištění [9].

Nejběžněji se HL dělí podle rozpustnosti. Za hlavní složky huminových látek jsou proto obvykle považovány huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a huminy [8]. HK jsou

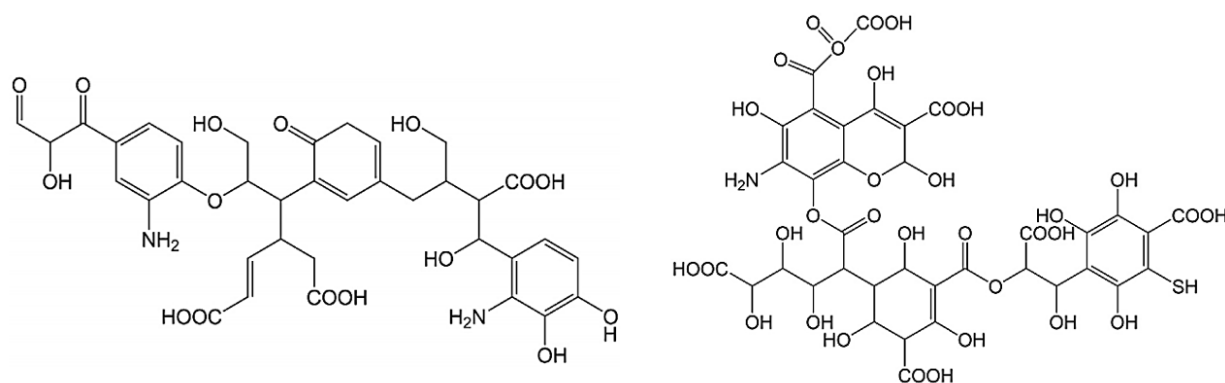
ve vodě rozpustné při pH menším než 2, fulvinové kyseliny jsou rozpustné v celém rozmezí pH a humin je taková frakce, která není rozpustná při žádné hodnotě pH [9]. Při hodnotě pH 2 se tedy huminové kyseliny z roztoku sráží, zatímco fulvinové kyseliny zůstávají v rozpuštěné formě [7], [9].

2.2.1 Struktura a vlastnosti huminových látek

Jedná se o látky strukturně složité. HL se skládají z chemicky heterogenních směsí sloučenin, a proto nemohou být jednoduše popsány a nemohou být úplně chemicky definovány jejich molekulové struktury. Nelze tedy určit molekulový vzorec HL, je pouze možné popsat obecnou strukturu typické molekuly [7].

Nicméně makromolekulární struktura HL se skládá z aromatických fenolických a heterocyklických “stavebních bloků“, které jsou spojeny pomocí atomů kyslíku, dusíku a síry, které tedy plní funkci můstků. Na makromolekulu mohou být navázány alifatické, polysacharidické, aminokyselinové a lipidické řetězce a také chemicky aktivní funkční skupiny, hlavně karboxylové, fenolické, hydroxylové, karbonylové atd. [7]. Obsah těchto různých funkčních skupin a jejich množství potom závisí na jejich původu, stáří, klimatu a prostředí [10]. Jak bylo již řečeno, HL jsou látky polydisperzní, což znamená, že se vyskytují ve velkém rozsahu molekulových hmotností [7].

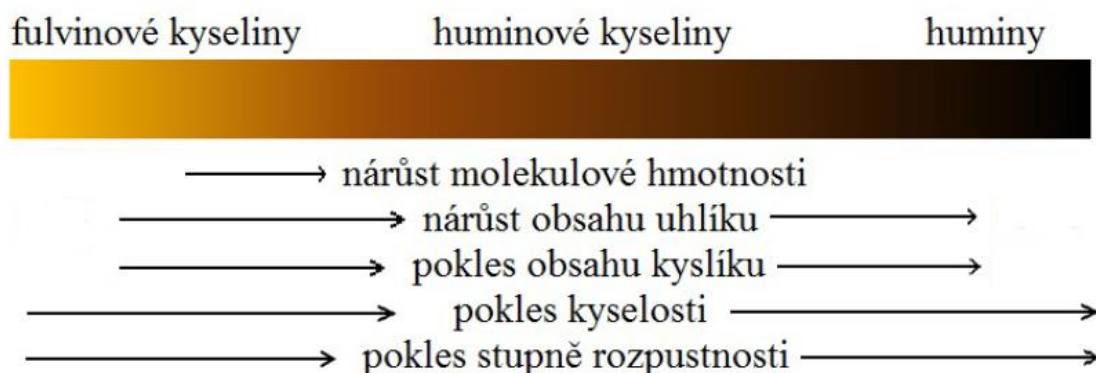
Mezi huminovými látkami působí hydrofobní interakce, tedy van der Waalsovy síly, π - π a CH- π interakce a také vodíkové vazby. HK tvoří supramolekulární struktury, které ve výsledku dosahují vyšších molekulových hmotností, než mají FK. Bylo navrženo, že jedním ze způsobů, jak lze popsat strukturu huminových látek, by mohlo být popsání jejich monomerních jednotek. Návrh na jeden z možných strukturních modelů monomerních HK a FK je znázorněn na Obr. 1 [11].



Obr. 1: Strukturní model monomerní jednotky HK (nalevo) a FK (napravo) [11]

FK obsahují tedy více funkčních skupin (karboxylových a fenolových), a proto mají i vyšší celkovou kyselost. HK oproti tomu obsahují větší počet aromatických struktur [11]. HL se liší také svým zbarvením. Barva fulvinových kyselin se pohybuje od světle žluté do žlutohnědé, huminy mají zbarvení černé [12]. Již zmíněné vlastnosti, kterými se jednotlivé frakce HL odlišují, jsou znázorněny na Obr. 2.

Huminové látky



Obr. 2: Vlastnosti frakcí huminových látek [13]

Díky své vyšší rozpustnosti bývají fulvokyseliny oproti ostatním frakcím HL v přírodních vodách v převaze [12]. Koncentrace organických sloučenin ve vodných vzorcích je většinou vyjádřena jako celkový organický uhlík (TOC – total organic carbon) nebo jako rozpuštěný organický uhlík (DOC – dissolved organic carbon). Příspěvek huminových látek v DOC definovaný pomocí specifických metod bývá většinou v rozmezí od 40 do 70 hm. %. Některé typické hodnoty v mg/l ve vodných systémech bohatých na HL jsou zobrazeny v Tab. 1 [7].

Tab. 1: Hodnoty obsahu DOC a HL ve vybraných vodných systémech [7]

| Zdroj | DOC (mg/l) | HL (mg/l) |
|---------------------|------------|------------|
| Mořská voda | 0,2 – 2,0 | 0,06 – 0,6 |
| Podzemní voda | 0,1 – 2,0 | 0,03 – 0,6 |
| Řeka | 1 – 10 | 0,5 – 4,0 |
| Dyje | 1,7 | 1,0 |
| Rýn | 2,2 | 1,3 |
| Jezero | 1 – 50 | 0,5 – 40 |
| Bodanské jezero | 1,2 | 0,6 |
| Odtok odpadních vod | 8,6 | 1,7 |

2.2.2 Huminové kyseliny

HK jsou rozpustné v alkalickém prostředí, částečně rozpustné ve vodě a nerozpustné v prostředí kyselém. Díky jejich amfifilnímu charakteru tvoří HK struktury podobné micelám při neutrálním až kyselém pH. Toho lze využít např. při rozpouštění polycyklických aromatických uhlovodíků, které jsou relativně nerozpustné ve vodě a vykazují toxicitu a karcinogenitu. Tyto

nepolární kontaminanty a HK spolu potom interagují a dochází k solubilizaci kontaminantů v hydrofobním jádru pseudo-micel huminových kyselin [10].

Při neutrálním pH je rozpustnost HK pouze částečná, proto je rozpouštění molekul HK ve vodě mnohem složitější než rozpouštění běžných málo rozpustných pevných látek. Protože jsou HK směsí složek, z nichž pouze některé složky jsou ve vodě rozpustné, při neutrálním pH se ve vodné suspenzi vyskytují jak rozpuštěné, tak pevné nerozpuštěné frakce HK [10].

2.2.3 Využití huminových látek

Huminové látky jsou široce využívány pro různé účely, a to v oblastech zemědělství, průmyslu, uplatňují se v oblasti ochrany životního prostředí, v medicínské a také ve farmakologické oblasti.

Huminové látky poskytují humusu důležité funkce, kterými jsou funkce akumulární, transportní, regulační, fyziologické a ochranné. Proto přispívají k nezbytným vlastnostem půdy včetně odbourávání, oxidační nebo redukční transformace organických xenobiotických molekul, stopových plynů a stopových kovů. HL mohou navíc vytvářet stabilní komplexy s kovy, díky jejich velkému množství funkčních skupin, jako jsou karboxylové, hydroxylové, fenolové a karbonylové skupiny. Fixace těžkých kovů je tedy důsledkem komplexace s funkčními skupinami obsahujícími kyslík. Tvorba komplexů je závislá na povaze HL, na iontové síle, na obsahu kovů a dalších kationtů, a také na pH půdy. HL se tedy využívají jako přípravky zlepšující vlastnosti znečištěné půdy a dále v zemědělství ke zlepšení růstu rostlin a obsahu živin v půdách [13]. Několik studií ukazuje, že HL regulují metabolické procesy související s růstem rostlin, kdy ovlivňují zejména kořenový systém rostliny [14].

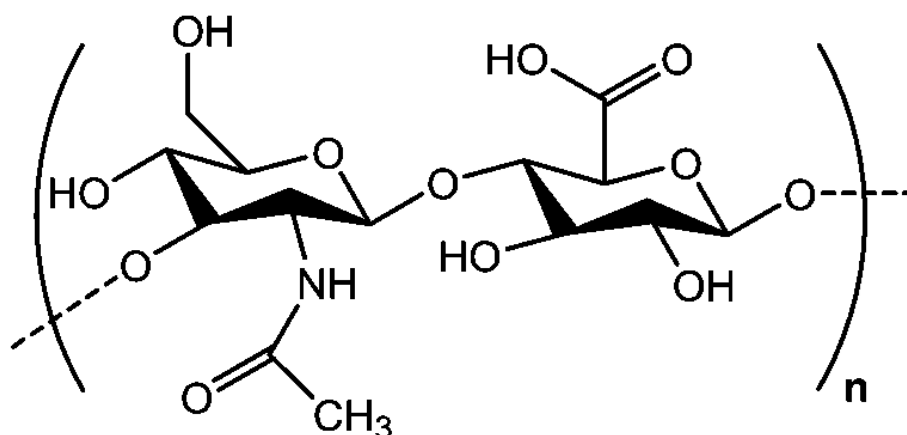
Důležitou roli hrají HL nejen v půdách, ale i ve vodách. Jednou z nejvíce důležitých funkcí ve vodných systémech je jejich funkce vyrovnávací, čímž je myšleno nejen vyrovnávání pH, ale i to, že biologická dostupnost kovů nebo xenobiotik je opět řízena HL. Vyskytují se ve všech vodných systémech a poskytují tak vynikající prostředek pro přepravu většiny základních, ale i toxických látek [7].

V medicíně mohou potom HL působit jako antivirotika a protizánětlivá činidla. Nacházejí využití např. při hojení ran a při léčbě rakoviny. Ve farmaceutické a kosmetické oblasti se HL nevyskytují příliš dlouho, ale jejich výzkum je slibný. Je o nich známo, že jsou schopné chránit před UV zářením a mohou působit jako antioxidanty, proto mohou být součástí přípravků na ochranu proti slunečnímu záření, proti stárnutí a v péči o pleť. Další aplikací HL je jejich použití jako solubilizační činidlo a transportní látka pro hydrofobní aktivní sloučeniny, kdy dojde k jejich enkapsulaci v hydrofobním jádře HL [10].

2.3 Kyselina hyaluronová

Hyaluronová kyselina je přírodní vysokomolekulární záporně nabitý lineární polysacharid, který je složen z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukoaminu spojených β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou. Struktura je znázorněna na Obr.

3. Při fyziologickém pH jsou všechny karboxylové skupiny disociovány a tvoří sodnou sůl. Proto je také nazýván jako hyaluronan sodný (HYAL). HYAL jako viskoelastické médium je hlavní složkou mezibuněčné hmoty obratlovců, je obsažen v pojivových tkáních, ve sklivci oka a v synoviální tekutině v mezikloubních spojích, kde napomáhá redukci nárazů [15], [16].



Obr. 3: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [17]

Hyaluronan je přítomen u všech obratlovců a také u některých patogenních bakterií, jako jsou *Streptococcus* a *Pasteurella* [16].

HYAL se navíc podílí na několika důležitých biologických procesech, jako je zprostředkování buněčné signalizace, regulace buněčné adheze, proliferace a dalších [15]. Hraje také klíčovou úlohu při regulaci zánětu, který je spojen s akumulací a přeměnou polymerního HYAL určitými buňkami [18]. Interakce HYAL s dalšími složkami mezibuněčné hmoty má navíc zásadní význam poskytující kompaktnost a potřebnou strukturu kůže [19].

Kyselina hyaluronová je syntetizována enzymy hyaluronan syntetázami, které k sobě spojují jednotlivé sacharidové jednotky [19]. Syntéza probíhá na plazmatické membráně a polymer je postupně vytlačován do extracelulárního matrix. Většina hyaluronanu je u člověka lokalizována hlavně v kůži [20], což odpovídá hmotnosti asi 8 g u dospělého člověka [16], přičemž přibližně 30 % tohoto polymeru je každý den nahrazeno. Tento proces degradace je uskutečňován hydrolytickými enzymy hyaluronidázami, které degradují HYAL na malé fragmenty [20]. Hyaluronan může být degradován také volnými kyslíkovými radikály, k čemuž dochází při zánětech [16].

Obecně lze kyselinu hyaluronovou extrahovat z různých tkáňových buněk obratlovců. Takto získaný HYAL je však drahý, protože způsob jeho získávání je náročný a obsah hyaluronanu je relativně malý. V současnosti se extrahuje ze zvířecích tkání např. z kohoutích hřebínků, z očního sklivce, z chrupavek a z tekutiny kloubních spojů. Může být získáván také fermentací bakterií *Streptococcus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Fermentace má mnoho výhod, mezi něž patří nízké náklady, jednoduché způsoby přípravy a neomezené suroviny [21].

2.3.1 Kyselina hyaluronová při fyziologickém pH a ve vodě

Hyaluronan je ve vodě rozpustný polysacharid, kde tvoří viskoelastickou tekutinu, ale netvoří gel [22]. Díky velkému množství hydroxylových a karboxylových skupin může molekula ve vodném prostředí obsahovat velký počet intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových vazeb a molekula se stáčí do jednoduché nebo dvojité šroubovice. V roztoku s vysokou koncentrací hyaluronanu se zvyšují interakce vodíkových vazeb a dochází k tomu, že jsou řetězce navzájem propleteny a mohou se tak tvořit prostorové síťované struktury, kdy si tyto struktury zachovávají svoji viskoelasticitu [21]. Díky jeho polaritě a tvorbě této síťované struktury je schopen HYAL zadržovat velké množství vody [22].

Při fyziologickém pH je hyaluronan vysoce nabitý kvůli množství karboxylových a hydroxylových skupin ve své struktuře, což vede k tomu, že může navázat velké množství vody [23]. Struktura je zpevněná díky intramolekulárním vodíkovým můstkům a interakcemi s rozpouštědlem. Předpokládá se, že molekula HYAL ve fyziologickém roztoku tvoří strukturu tuhé náhodné spirály, která zaujímá velkou plochu [16]. Její tuhost je přičítána elektrostatické repulzi mezi karboxylovými skupinami a vodíkovými můstky mezi sousedními monosacharidovými jednotkami a/nebo vodíkovými můstky obklopující molekulu vody [24]. Tato struktura má zajímavé a důležité následky. Malé molekuly jako je voda, elektrolyty a živiny mohou díky své velikosti volně difundovat skrz tuto doménu, velké molekuly jako proteiny jsou ale částečně vyloučeny. To vede k pomalejší difuzi makromolekul skrz domény hyaluronanu, než je difuze v okolním prostředí [16]. Dále bylo prokázáno, že sekundární struktura vázána vodíkovou vazbou tvoří –CH skupiny, které dávají některým částem polymeru hydrofobní charakter. Bylo navrženo, že tyto hydrofobní domény mohou zprostředkovávat sebeagregaci a být základem interakce s lipidovými membránami a bílkovinami *in vivo* [24].

2.3.2 Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na jeho vlastnosti

Ve své základní homeostatické a nativní formě je polymerní řetězec hyaluronanu ve formě vysokomolekulárního řetězce s velikostí nad 1 000 kDa. V této formě vykazuje biofyzikální vlastnosti, kdy slouží jako lubrikant, a poskytuje hydrataci tkání [25]. Tento vysokomolekulární hyaluronan ve srovnání s nízkomolekulárním disponuje vyšší viskozitou a také vyšší biokompatibilitou [15].

Navzdory své jednoduché primární struktuře bylo zjištěno, že molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové silně ovlivňuje její biologickou funkci, kdy tyto funkce mohou být často protichůdné. Obecně se uvádí, že vysokomolekulární HYAL vytvořený za homeostatických podmínek působí antiangiogenně (neumožňuje vznik nových krevních kapilár) a protizánětlivě. Naopak nízkomolekulární hyaluronan, tj. HYAL s molekulovou hmotností typicky nižší než 300 kDa, pocházející z vysokomolekulárního HYAL jeho degradací, je angiogenický, takže stimuluje tvorbu nových krevních kapilár. Dále se vyznačuje vlastnostmi imunostimulačními (podporuje imunitní systém), aktivuje makrofágy a působí zánětlivě [26], [16].

Některé studie ukazují, že molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňuje také buněčnou proliferaci. Vysokomolekulární HYAL buněčnou proliferaci inhibuje a v přítomnosti nízkomolekulárního HYAL je proliferace větší [15].

2.3.3 Využití hyaluronanu

Díky své biokompatibilitě, vysoké hydrofilitě, jedinečným biologickým vlastnostem a snadné modifikaci polymeru je kyselina hyaluronová rozsáhle zkoumána pro mnoho biomedicínských aplikací, jako je tkáňové inženýrství, cílené dodávání léčiv a regenerativní medicína [27]. Má protizánětlivé, protirakovinné, antiproliferativní a antidiabetické účinky. Pro léčbu různých typů onemocnění se používá v různých formách jako hydrogely, filmy, krémy, pěny a gely [17].

Studie ukazují, že deriváty HYAL urychlují proces hojení popálenin, epitelizujících chirurgických ran a ran chronických. Bylo prokázáno, že kyselina hyaluronová je schopna aktivovat specifické funkce buněk kožní tkáně, jako jsou fibroblasty, endotelové buňky a makrofágy tak, že se zlepší proces uzavírání a hojení rány. Je to způsobeno tím, že HYAL a jeho degradační produkty vytvořené v ranách aktivují proliferaci fibroblastů a tvorbu nových cév [19].

Kyselina hyaluronová může být v medicíně využita i jako nosič s postupným uvolňováním pro různá léčiva, konkrétně pro léčiva protinádorová, protizánětlivá a pro anestetika [21]. V systémech cíleného dodávání léčiv zlepšuje prostupnost přes biologické membrány a zlepšuje účinnost a akumulaci léčiv na cílených místech [17].

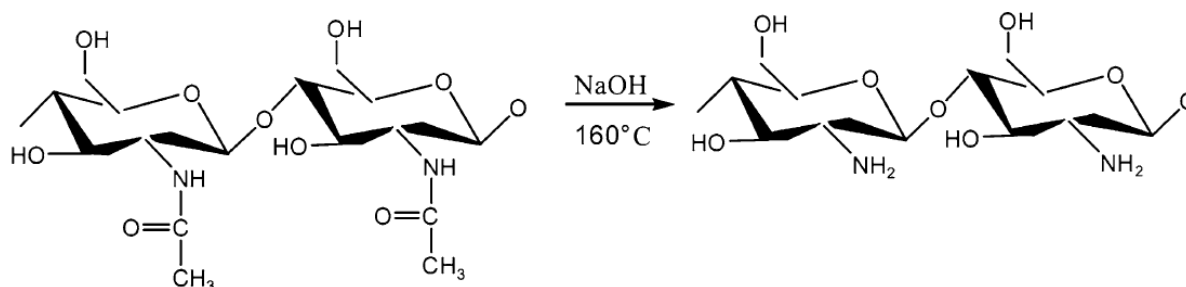
Mnoho klinických studií zjistilo slibný potenciál ve využití hyaluronanu při léčbě kloubních onemocnění. HYAL podporuje mobilitu kloubů regulací viskoelasticity synoviální tekutiny. Při využití v této oblasti hraje roli také jeho molekulová hmotnost. Analýza ukázala, že HYAL s vysokou molekulovou hmotností je lepší než produkty s molekulovou hmotností nižší [17]. HYAL je využíván i v očním lékařství, kde lze najít mnoho produktů obsahujících tento polysacharid [16]. Tvoří například hlavní složku umělých slz a přidává se do kontaktních čoček [28].

V kosmetickém průmyslu nachází HYAL také velké uplatnění. Je aktivní složkou v kosmetických výrobcích. Léčba kyselinou hyaluronovou podporuje tvorbu kolagenu a viskoelasticitu kůže. Hygrokopická povaha potom poskytuje pleti hydrataci a dodává jí mladistvý vzhled. Používá se tak proto hlavně v přípravcích proti vráskám a stárnutí [17]. Tato přirozeně se vyskytující biomolekula se aplikuje jako dermální výplň, což je kosmetický zákrok, kdy je kyselina injekcí vpichována do dermis kvůli obnově pleti a minimalizaci vzniku vrásek [29].

2.4 Chitosan

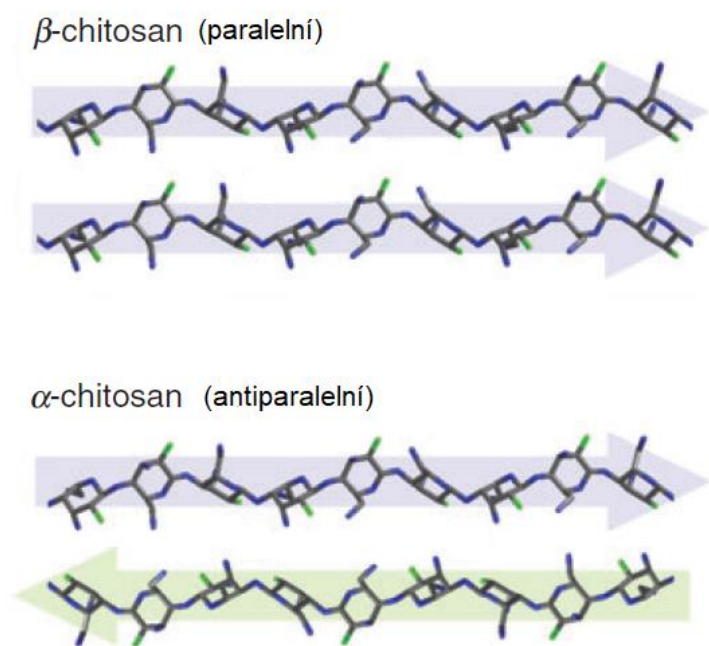
Chitosan je lineární polymer vyskytující se přirozeně pouze u hub *Mucoraceae*. Skládá se z monomerů glukosaminu a N-acetylglukosaminu, které jsou navzájem propojeny β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami. Zcela N-acetylovaná forma chitosanu se nazývá chitin, který se

nachází v exoskeletonu hmyzu a koryšů a v buněčných stěnách některých hub. Chitin je druhým nejrozšířenějším biopolymerem na Zemi po celulóze, přičemž se jejich struktura liší tím, že chitin má namísto hydroxylové skupiny na druhém (C-2) uhlíku skupinu aminovou [30], [31]. Chitosan se následně získá N-deacetylací chitinu, kdy dojde k přeměně acetamidové skupiny v amino skupinu. Nicméně deacetylace chitinu není nikdy kompletní a deacetylovaný chitin obsahuje stále nějaké acetamidové skupiny [31]. Tyto dva polymery mohou být rozeznány podle rozpustnosti v 1mol. % vodném roztoku kyseliny octové. Chitin obsahující asi více než 40 % jednotek N-acetylglukosaminu je v roztoku nerozpustný, a naopak chitosan se v tomto roztoku rozpouští [32]. Chitosan je chemicky více aktivní než chitin díky přítomnosti primárních a sekundárních hydroxylových skupin na každé opakující se jednotce a také díky aminové skupině na každém deacetylovaném monomeru. Struktura těchto dvou polymerů je znázorněna na Obr. 4 [31].



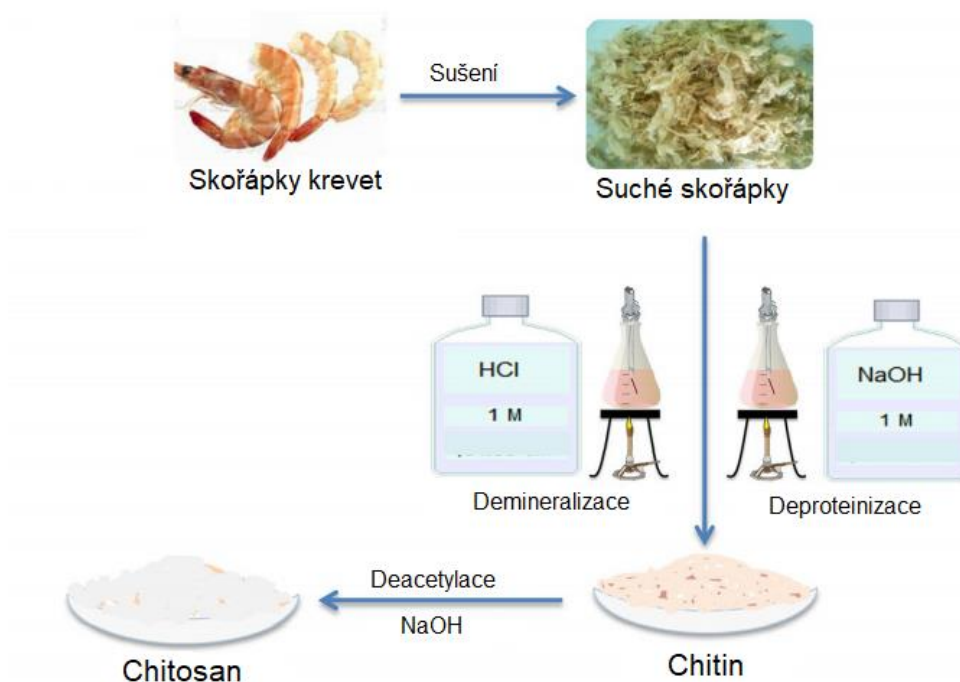
Obr. 4: Získávání chitosanu z chitinu jeho deacetylací [31]

Chitosan a chitin se vyskytují ve dvou konfiguracích. Většina surového chitosanu pochází ze skořápek krevet nebo krabů, přičemž chitosan pocházející z těchto koryšů je v α -konfiguraci. Ve výzkumech se většinou pracuje s touto modifikací. β -konfigurace je běžně získávána z olivní rodu *Loligo*. Rozdíly mezi těmito konfiguracemi jsou obecně založeny na krystalické struktuře molekul. Chitin v α -konfiguraci je stabilní díky vodíkovým vazbám, které se vyskytují mezi jednotlivými řetězci a dochází k tvorbě antiparalelních vrstev, zatímco β -chitin je v paralelním uspořádání s relativně slabými intermolekulovými silami. Paralelní a antiparalelní uspořádání těchto dvou modifikací je znázorněno na Obr. 5 [33].



Obr. 5: Paralelní a antiparalelní uspořádání chitosanu [33]

Primární zdroje α -chitinu a chitosanu jsou z odpadních frakcí krabů, krevet a raků. Při chemické izolaci z koryšů dochází nejprve k demineralizaci skořápek působením kyseliny a následuje krok rozpuštění proteinů pomocí alkalické extrakce. Celý proces, kterým lze izolovat chitosan například ze skořápek krevet je znázorněn na Obr. 6 [32], [34].



Obr. 6: Proces získávání chitosanu ze skořápek krevet [34]

2.4.1 Chitosan a voda

Nenabitý neutrální chitosan je ve vodě nerozpustný, a navíc je schopen na sebe vázat mnohem méně vody, než když je izolován např. ve formě chlorhydrátu. V tomto nabitém stavu se ve vodě rozpouští. Derivatizací lze tedy získat formu chitosanu, která je ve vodě rozpustná [35].

Chitosan obsahuje tři různé polární funkční skupiny – hydroxylovou skupinu $-OH$, primární aminovou $-NH_2$ a etherovou $C-O-C$ a v závislosti na stupni deacetylace také zbytkové karbonylové skupiny $C=O$. Přítomnost těchto skupin dává chitosanu možnost vázat molekuly vody [36].

Tento polymer má tedy hygroskopickou povahu, která vede např. k tomu, že v chitosanových filmech dochází ke strukturním změnám, které jsou indukovány právě vodou a tyto změny mají velký efekt na molekulovou mobilitu a funkční vlastnosti filmu [6]. Yakimets a kol. stanovili obsah vody v biopolymerních filmech jako kritickou proměnnou, která vede k vodou indukovaným transformacím. Může tak docházet například k přechodu z amorfní do krystalické fáze, což má velký vliv na již zmíněnou mobilitu molekul a funkční vlastnosti chitosanového filmu. Krystalická struktura hydratovaného chitosanu je ve tvaru dvojité šroubovice. Tato struktura může být jednoduše přeměněna na formu dehydratovanou, která se liší strukturou a samozřejmě obsahem vody [5].

2.4.2 Vlastnosti a využití chitinu a chitosanu

Aplikace chitosanu zahrnují celou řadu oblastí, jako je farmacie, lékařství, výroba papíru, biotechnologie, kosmetika, zpracování potravin a zemědělství. Chitin i chitosan vykazují různé vlastnosti, které jim otevírají možnosti využití také v oblasti biomedicíny. Nejnovějšími pokroky biomedicíny jsou důležité trendy týkající se tkáňového inženýrství a léčby ran. Chitin a chitosan jsou netoxické, biokompatibilní a biodegradabilní materiály, které lze použít k léčbě, augmentaci nebo nahrazení jakékoli tkáně nebo orgánu v těle. Již dlouhodobě se jimi, jakožto možnými urychlovači hojení ran, zabývá mnoho vědců. Chitin a jeho deriváty lze bezpečně aplikovat na zvířata i člověka. Produkty z chitinu pro lékařské aplikace jsou k dispozici v mnoha formách, konkrétně např. jako jemně mletý prášek, netkané textilie, lyofilizované měkké flísy nebo gely a jako laminované nebo průhledné fólie. V některých nedávných studiích byly demonstrovány i další důležité biologické vlastnosti chitinu a chitosanu, kterými jsou vlastnosti analgetické, protinádorové, hemostatické, hypocholesterolemické a antioxidační [31].

Chitosan může také posloužit jako antimikrobiální činidlo. Jeho schopnost inhibovat mikrobiální růst je však pozorován pouze v kyselém prostředí, kde je tento polymer rozpustný [30]. Je to přítomnost aminoskupin v makromolekule, která určuje podmínky jeho rozpouštění. Rozpustnost je v podstatě závislá na pH. V kyselém prostředí jsou tyto aminoskupiny protonovány a vzniká tak chitosan, který, jak již bylo řečeno, je rozpustný. V alkalickém prostředí jsou skupiny převedeny zpět na aminoskupiny a chitosan je opět v původním stavu a nerozpouští se [37]. Aby docházelo k jeho rozpouštění i ve vodném prostředí, provádí se jeho derivatizace, která současně zvyšuje i jeho antimikrobiální vlastnosti [30]. Tahle schopnost je

také závislá na molekulové hmotnosti. Ve srovnání s vysokomolekulovým, může oligomerní chitosan jednoduše penetrovat přes buněčnou membránu mikroorganismů, kde inhibuje transkripci RNA a tím zabraňuje růstu buňky [31].

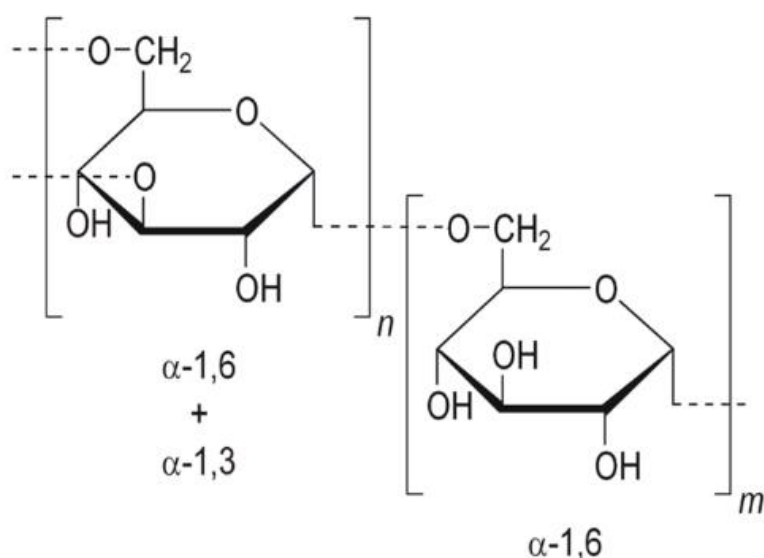
Protože chitin a chitosan mohou jednoduše tvořit hydrogely, které mohou mít širokou oblast využitelnosti, byly vyvinuty chitosanové hydrogely s různými strukturami a s žádoucími účinky, nacházející uplatnění konkrétně např. v tkáňovém inženýrství, enzymové imobilizaci a v kontrolovaném uvolňování a cíleném dodávání léčiv [38].

Chitosan je taktéž dobrý filmotvorný materiál a jeho strukturní vlastnosti s jeho biodegradabilitou se dají využít v potravinářství při balení potravin, a to také dokonce v jedlé formě balení [6].

Nachází uplatnění také jako adsorbent a může tak pomoci při odstraňování toxických těžkých kovů a aniontových organických polutantů. Chitosan je schopen chelatačně vázat kovové ionty a tyto komplexy chitosanu s kovy mohou ještě zvyšovat interakce mezi polutanty a těmito komplexy. Avšak díky své struktuře může β -chitosan chelatačně navázat více kovových iontů než chitosan v α -konfiguraci. Z toho vyplývá, že komplexy β -chitosanu s kovy mají lepší adsorpční vlastnosti, než komplexy s α -chitosanem [33].

2.5 Dextran

Dextran je definován jako homopolysacharid glukózy. Glukózové jednotky jsou mezi sebou obvykle spojeny více než z 50 % α -(1 \rightarrow 6) vazbami v hlavním řetězci. Dále mohou být jednotky připojeny také α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) nebo α -(1 \rightarrow 4) vazbami. Struktura dextranu je znázorněna na Obr. 7. Dextran se může vyskytovat v několika typech, které se liší svou strukturou, přičemž je tato struktura závislá na původu mikrobiálního kmene, ze kterého dextran vzniká. Je produkován bakterií mléčného kvašení, zejména kmeny *Streptococcus* a *Leuconostoc mesenteroides*. Dextran z kmene *Streptococcus*, vyskytující se v dutině ústní, je předmětem klinického zájmu, protože je součástí dentálního plaku a zároveň je tento glukan prostředím pro množení této bakterie. Dextran z *L. mesenteroides* je v komerčním zájmu primárně jako speciální chemikálie pro klinické, farmaceutické a průmyslové použití. Fyziologická funkce dextranu produkovaného *L. M.* je zatím neznámá [16].



Obr. 7: Chemická struktura dextranu [39]

Čistý dextran je bílá, pevná látka. Ostatní fyzikální a chemické vlastnosti se liší v závislosti na specifické chemické struktuře. Dextran s největším procentuálním zastoupením α -(1 \rightarrow 6) vazeb je obvykle nejvíce rozpustný ve vodě. Dextran z *L. mesenteroides* je ve vodě úplně rozpustný a stejně tak i v dalších rozpouštědlech, včetně močoviny, glycinu, formamidu, glycerolu atd. Roztoky dextranu se chovají jako Newtonovské kapaliny a jejich viskozita je funkcí koncentrace, teploty a průměrné molekulové hmotnosti. Dextran je polydisperzní a většinou vysokomolekulární. Obvykle se jeho molekulová hmotnost pohybuje v rozmezí 10^6 Da a 10^9 Da [16].

2.5.1 Aplikace dextranu

Protože obsahuje dextran volné hydroxylové skupiny, představují tyto skupiny potenciální cíle pro jeho chemické deriváty, přičemž nejvhodnějšími jsou dextrany s nízkým stupněm větvení. Bylo demonstrováno množství chemických aplikací dextranu, konkrétně jde o využití při operacích ropného vrtání, v zemědělství, při výrobě fotografického filmu, v potravinářství a dalších [16]. V potravinářství ho lze aplikovat například jako složku při pečení, kdy dextran zlepšuje vlastnosti a chuť upečeného chleba [40]. V současnosti jsou dextran a jeho deriváty primárně využívány jako speciální chemikálie pro klinické, farmaceutické a průmyslové použití. Hydrolyzované frakce dextranu mají potenciál jako koloidy pro infuzní terapii. Tyto koloidy v podstatě nahrazují normální proteiny, které zajišťují osmotický tlak potřebný pro vytlačování intersticiální tekutiny do plasmu. Léčba je užitečná k prevenci šoku při krvácení, popálení, při operaci. Dextran může také zlepšovat proudění krve a tím zabránit agregaci erytrocytů, čímž snižuje riziko trombózy a embólie [16].

Protože je biokompatibilní, netoxický a neimunogenní, je dextran široce využíván i v systémech cíleného podávání léčiv [41]. Konkrétně například acetalizace dextranu má za následek to, že se polymer stane hydrofobním, což umožňuje enkapsulaci hydrofobních a

dalších léčiv, které by bylo složité podávat. Kromě toho je dextran s acetalovou skupinou citlivý na kyselé prostředí a při nižším pH, jako je pH endosomu fagocytárních buněk, nádorů nebo oblastí zánětu, zde dochází k rychlé degradaci tohoto polymeru a následnému uvolnění léčiva v cíleném místě [42].

Oxidovaný dextran může tvořit hydrogel a kupříkladu s modifikovou želatínou tak nachází uplatnění v tkáňovém inženýrství [43].

V poslední době je velký zájem o „zelené“ látky čili látky bez negativního vlivu na lidské životy a prostředí. Dextran tedy může mít využití i v tomto směru. Díky tomu, že obsahuje kyslíkové heteroatomy, splňuje jednu ze základních požadavků jakožto inhibitor koroze. Na základě několika výsledků bylo zjištěno, že modifikovaný dextran je účinný inhibitor koroze oceli ve velmi kyselém prostředí [39].

Tang a kol. v práci [44] zkoumali využití dextranu v oblasti potravinářství, konkrétně ve zmraženém těstě s obsahem lepku. Přídavkem dextranu došlo ke zvýšení obsahu vody v lepku a také k oddálení dehydratace lepku a redistribuci vody způsobené zmrazovacími a rozmrazovacími cykly. Dextran udržel strukturní integritu lepku a předpokládá se efekt zpomalující rekrystalizaci krystalů ledu. Tyto výsledky dokazují slibnou možnost využití dextranu jako kryoprotektantu v potravinářství.

2.6 Současný stav řešení problematiky

Studiem hydratace a interakcemi mezi vodou a biopolymery nebo biokoloidy se ve svých publikacích věnuje poměrně velké množství autorů, kdy ke studiu využívají mnoho odlišných technik.

M. Grossutti a kol. v následující studii [3] použili metodu ATR-IR (infračervená spektroskopie zeslabené úplné reflektance) k měření IR absorpčních spekter tří polysacharidových filmů, z nich dvou lineárních – kyseliny hyaluronové, chitosanu a dále pak jedné větvené dendrimerické molekuly fyto glykogenu. IR spektroskopie je vhodnou metodou pro charakterizaci struktury vody v polysacharidech, protože poskytuje přehled o síle a o uspořádání chemických vazeb. Měření absorpčních spekter v této studii probíhalo při různých hodnotách relativní vlhkosti (RH). RH byla řízena nastavením relativních množství konstantních proudů suchého plynného dusíku a vodou nasyceného dusíku. Tyto proudy procházely přes zkoumaný film a RH byla měřena pomocí senzoru vlhkosti. U všech polysacharidů došlo ke zvýšení IR absorpce se zvyšováním RH. Srovnáním výsledků autoři našli podobnosti mezi nevětvenými lineárními polysacharidy, zatímco větvená molekula fyto glykogenu se od nich velice lišila. Nanočástice fyto glykogenu vykazovaly vysoký stupeň vysoce uspořádané sítě molekul vody a velké zvýšení frakcí neuspořádaných klastrů vody se zvyšující se RH, zatímco struktura vody v HYAL a v chitosanu byla ke změně RH relativně necitlivá. Z toho může vyplývat, že vysoký stupeň větvení vede k mnohem více uspořádané struktuře sorbované vody, což svědčí o tom, že uspořádání řetězců silně ovlivňuje strukturu vody.

2.6.1 Huminové látky

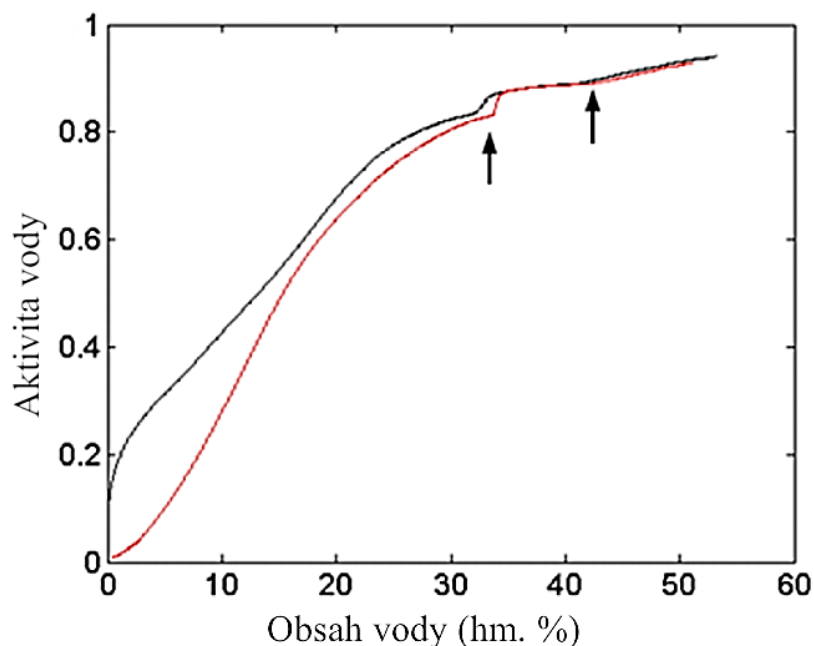
V práci [45] testovali Z. Cihlár a kol. zesíťování funkčních skupin v polárních doménách lignitických huminových kyselin s využitím karbodiimidové vazby a analyzovali, do jaké míry ovlivnila tato modifikace jejich hydratační vlastnosti a stabilitu. K zesíťování použili rozpustný N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) a ve vodě nerozpustný N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) za různých podmínek. Obě metody vedly k tvorbě zesíťovaných huminových struktur. K monitorování průběhu sorpce vlhkosti a hydratace použili metodu ^1H NMR (protonovou nukleární magnetickou rezonanci). Prováděli dva experimenty, kdy v prvním kroku byla studována sorpce vlhkosti, tedy hydratace polárních domén a jejich prostředí. V druhém kroku byla potom pipetou přidána voda pro hydrataci celé struktury a vyvolání botnání.

Použití EDC vykazovalo menší stupeň zesíťování, ale lepší hydratační vlastnosti. Byla pozorována vyšší sorpce vlhkosti a kapacita zadržování vody v huminových kyselinách, které byly před zesíťováním předem vlhčené po dobu nejméně 24 hodin. Ačkoli EDC deriváty HK obsahovaly jen asi 60 až 85 mol. % původních volných karboxylových skupin, jejich sorpce vlhkosti byla podobná jako v původní HK. V nasycených podmínkách EDC deriváty vykazovaly rychlejší botnání a dosáhly téměř stejné kapacity zadržování vody jako původní vzorek po 18 dnech. Nicméně EDC a DCC deriváty začaly degradovat už po několika dnech, kdy pravděpodobně voda destabilizovala kovalentní vazby v těchto derivátech. Výsledky naznačovaly, že kapacita zadržování vody, kinetika botnání a absorpce vlhkosti huminových kyselin nebyly výrazně ovlivněny jen množstvím polárních skupin, ale i jejich prostorovým uspořádáním a distribucí.

2.6.2 Hyaluronan

C. Alber a kol. v práci [24] poprvé použili metodu izotermní skenovací sorpční kalorimetrie (isothermal scanning sorption calorimetry) ke sledování změn ve struktuře hyaluronanu indukovaných hydratací. Tato metoda poskytuje současně sorpční izotermu, entalpii a entropii hydratace. Experimenty byly prováděny při 25, 40 a 50 °C ve dvoukomorové cele, která byla vložena do mikrokcalorimetru. Do dolní odpařovací komory byla vždy na začátku experimentu vstřikována voda. V průběhu docházelo k odpařování vody a vlhkost byla absorbována vzorkem v horní sorpční komoře. Uvolněná tepla v obou komorách byla při tomto ději současně monitorována. Pro srovnání s původním suchým HYAL připravili i druhý vzorek, kdy byl HYAL nejprve smíchán s vodou (85 hm. % H_2O), ponechán tak několik dní a následně před sorpčním experimentem byl znovu vysušen ve vakuu a byl rozemlet. Na Obr. 8 jsou znázorněny křivky sorpčních izoterm při 25 °C a lze vidět, že neošetřený materiál absorboval více vody při nízkých aktivitách vody (aktivita voda – obsah volné vody) v porovnání s HYAL ošetřeným vodou. To naznačuje jeho menší uspořádanost, zatímco ošetření vodou indukovalo ve struktuře hyaluronanu tvorbu krystalických částí. Při vyšších aktivitách vody se sorpční izotermny neošetřeného HYAL a semikrystalického HYAL shodují. U obou křivek došlo ke skoku – pro neošetřený HYAL při 34 hm. % a pro ošetřený semikrystalický HYAL při 32,5 hm. % vody. Při těchto hodnotách proběhla krystalizace látek (označeno první šipkou na Obr. 8). Při dalším zvyšování byla aktivita vody konstantní až do hodnoty 42 hm. % (vyznačeno druhou šipkou na

Obr. 8). Nad touto hodnotou aktivita vody opět vzrůstá, což svědčí o jednofázovém roztoku, takže došlo k rozpuštění vytvořených krystalů.



Obr. 8: Sorpční izotermie neošetřeného HYAL (červená křivka) a stejného materiálu rekrytalizovaného před hydratací (černá křivka) [24]

Křivky entalpie a entropie jsou pro oba vzorky podobné, vykazují tedy podobné změny při hydrataci, avšak v předem ošetřeném HYAL jsou tyto změny méně výrazné. Při asi 25 hm. % vody dochází ke skelnému přechodu. K dalším krokům jako je krystalizace a následné rozpuštění krystalů dochází při podobných hodnotách hm. % jako je tomu u křivek sorpčních izoterm. Tyto výsledky se tedy shodují.

Dále v této studii [24] byla použita metoda DSC, kdy Alber a kol. zkoumali chování vzorků hyaluronanu s různým obsahem vody. Při obsahu vody 45 – 96 hm. % byla teplota skelného přechodu (T_g) nezávislá na obsahu vody a ke skelnému přechodu docházelo okolo hodnoty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco při nízkém obsahu vody (0 – 35 hm. % vody) měla teplota skelného přechodu na obsah vody velký vliv. Při zvýšení obsahu vody docházelo ke snižování T_g . Zjistili také, že krystalizace HYAL s vysokým obsahem vody byla endotermickým dějem. Naopak při nižším procentuálním obsahu vody a vyšší teplotě byla krystalizace exotermická. Toto odlišné chování může být založeno hlavně na hydrofobním efektu.

2.6.3 Chitosan

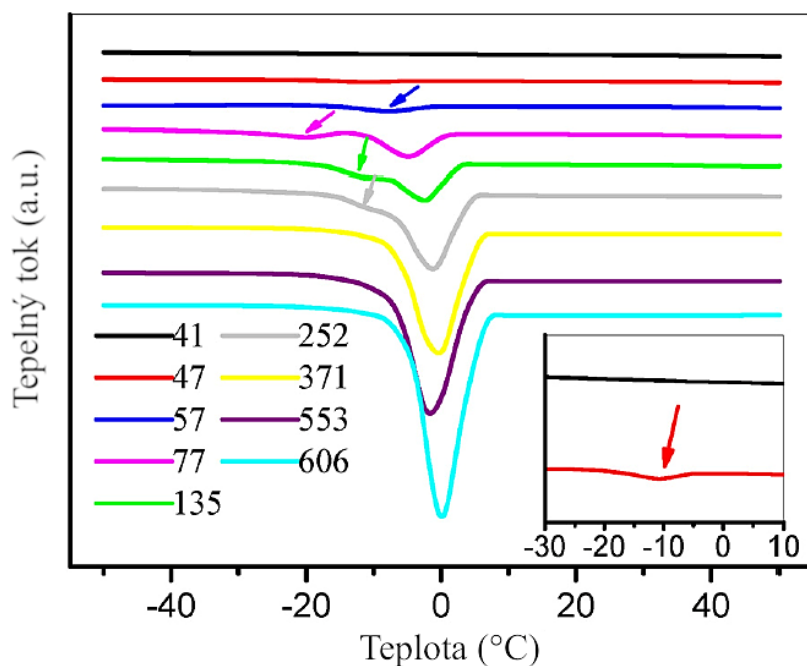
S. Alvarado a kol. se zabývali v práci [46] filmy složenými z chitosanu a rybí želatiny v různém poměru, které pak mohou posloužit jako obalový materiál v potravinářství. Filmy byly podrobeny zkouškám pevnosti v tahu a propustnosti vodní páry. Výsledky ukázaly, že pevnost v tahu se snížila se zvýšením relativní vlhkosti (RH) a také zvýšením obsahu želatiny. Propustnost vodní páry přes chitosanový film byla zjišťována pomocí cely, na jejíž horní části byl připevněn tento film a pod ním v cele byla umístěna destilovaná voda pro dosažení RH

blízké saturace. Celá cela pak byla umístěna v komoře s řízenou teplotou a obsahující silikagel, kvůli udržení suchého prostředí. V průběhu odpařování vody a propouštění těchto molekul skrz film byla zaznamenávána hmotnostní změna buňky s filmem pomocí analytických vah. Bylo prokázáno, že propustnost vodní páry se úměrně zvyšovala se zvětšováním RH. Experiment také dokazuje, že přidání želatiny snížilo schopnost chitosanových filmů absorbovat vodu z hodnoty 110 hm. % na hodnotu 34 hm. % při podmínkách s relativní vlhkostí 84 obj. %. Ačkoli je želatina rozpustná ve vodě, výsledky naznačují, že díky interakcím mezi chitosanem a želatinou při tvorbě filmu, dojde k omezení počtu možných míst právě pro vazbu vody, což snižuje schopnost filmu vodu absorbovat. Jako nejvhodnější ze studovaných směsí se ukázal být film tvořen ze 75 hm. % chitosanem a z 25 hm. % rybí želatinou.

Vliv vody na krystalovou strukturu chitosanových filmů a vazby mezi vodou a chitosanem byly zkoumány C. Qiao a kol. v práci [6] pomocí technik X-ray diffraction – rentgenové difrakce a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Přítomnost vlhkosti v matici polymeru má významný vliv na její krystalickou strukturu, což dokazují výsledky strukturní analýzy v této studii. Změny vyvolané obsahem vody v krystalické struktuře filmů mohou být připisovány k uspořádání hydratovaných a volných chitosanových řetězců v amorfních oblastech chitosanu. Při nízkém stupni hydratace s největší pravděpodobností penetrují molekuly vody do amorfních oblastí, což vede ke zvýšení mobility amorfních řetězců. Dalším zvyšováním vlhkosti tudíž dochází k ještě větší mobilitě těchto řetězců, a to vede k tvorbě krystalických domén. Krystalizaci chitosanu po hydrataci potvrzují i výsledky mechanických zkoušek, kdy se smícháním chitosanových filmů s malým množstvím vody zlepšily vlastnosti v tahu.

Obsah vody v chitosanovém filmu při různých relativních vlhkostech při 25 °C byl zjišťován pomocí TGA. Chitosanové filmy vykazují nízkou adsorpční aktivitu při nízkých relativních vlhkostech. Rovnovážný obsah vody se zvyšuje se zvyšující se vlhkostí a tento trend je více výrazný při vyšších vlhkostech [6].

Dále v práci [6] byly pomocí DSC zaznamenávány křivky chitosanových filmů s různým obsahem vody. Křivky jsou zobrazeny na Obr. 9. Při 41 hm. % obsahu vody nebyl v celém rozsahu teplot na křivce zaznamenán žádný endotermní pík, který by byl připisován tání mrznoucí vody. Tento pík byl viditelný až při zvýšení obsahu vody na hodnotu 47 hm. %, a to při teplotě -10 °C. Tak nízká teplota tání vody může být připisována tomu, že se ve struktuře chitosanového filmu vyskytují nanokavity. Při hodnotě 77 hm. % obsahu vody se v záznamu objevují dva endotermní píky. Pík při vyšší teplotě odpovídá tání volné vody v chitosanu a pík při nižší teplotě je vykreslen opět díky nanokavitám ve struktuře. Se zvyšujícím obsahem vody se pík v nižších teplotách pohybuje směrem k teplotám vyšším, zatímco druhý pík zůstává ve stejné hodnotě teploty jako při nižším obsahu vody, a tou je teplota blízko 0 °C. S obsahem vody v rozmezí od 371 hm. % do 606 hm. % tyto dva píky postupně přecházejí v jeden, který se pohybuje okolo hodnoty 0 °C.



Obr. 9: DSC záznam chitosanových filmů s různým obsahem vody (hm. %). Pozice píků odpovídající tání jsou vyznačeny šipkou [6].

Následně v tomto experimentu [6] výsledky z FTIR ukázaly, že posuny pásů a změny intenzit křivek jsou spojeny s tvorbou vodíkových vazeb mezi molekulami vody H_2O a OH nebo NH skupinami v chitosanu. Změny jsou také způsobeny tvorbou vodíkových můstků mezi molekulami vody a C=O skupinami. Podle výsledků je také patrné, že mezi H_2O a NH_3^+ skupinami nejsou tvořeny žádné významné vodíkové vazby a z toho plyne, že interakce molekul vody s hydroxylovými skupinami jsou silnější než s aminovými skupinami v chitosanových filmech. Všechny tyto poznatky ukazují, že změnou obsahu vody v takovýchto systémech je možné ovlivňovat nebo řídit mikrostrukturu a některé vlastnosti polymerů.

2.6.4 Dextran

B. Fei a kol. v práci [47] zkoumali vliv sorbovaného množství vody a dalších rozpouštědel v závislosti na molekulové hmotnosti dextranu. Experiment probíhal pomocí jednoduché metody, kdy byl prášek dextranu umístěn ve skleněné tenké kapiláře. Tato kapilára byla zavěšena a pod ni byla umístěna nádoba s kapalinou tak, aby byla kapalina v kontaktu se dnem skleněné kapiláry a mohlo tak docházet ke spontánní penetraci kapaliny do kapiláry s dextranem. Jakmile došlo ke zvlhnutí dextranu, byla počítačem zaznamenána hmotnost adsorbovaného množství. Výsledky ukázaly, že vzorky s nižší molekulovou hmotností vykazovaly největší adsorpci ve srovnání s dextrany s molekulovou hmotností vyšší. Předpokládá se, že je to důsledkem větvené struktury dextranu, kterou má dextran s vyšší molekulovou hmotností větvenější. Zároveň také prokázali, že je tento polymer schopen sorbovat jak polární, tak i nepolární rozpouštědla.

Ve studii [48] P. Faucard a kol. syntetizovali vysokomolekulární dextrany s požadovanou strukturou větvení. Následně z roztoků těchto dextranů byly vytvořeny dextranové filmy. Pomocí dynamické mechanické analýzy (DMA) se systémem kontrolujícím vlhkost, který pracuje se směsí suchého a vodou nasyceného vzduchu, byl měřen konzervativní modul. Modul byl měřen při 20 °C od 10 do 80 obj. % relativní vlhkosti (RH). Byly zkoumány tedy mechanické vlastnosti filmů v závislosti na relativní vlhkosti. Od 10 obj. % do 50 nebo 60 obj. % RH byla hodnota konzervativního modulu vysoká, při vyšších hodnotách RH došlo k výraznému poklesu, a to kvůli blízkosti skelného přechodu filmu. Ve skelném stavu při 20 a 30 obj. % RH byl u všech filmů pozorován malý nárůst konzervativního modulu. P. Faucard a kol. předpokládali, že tento nárůst může být způsoben strukturou vazeb v dextranovém filmu, přičemž vazby při těchto nižších hodnotách RH zvyšují rigiditu filmu. Toto zvýšení tuhosti je pozorováno i u dalších polysacharidů (např. u škrobu) a odpovídá antiplastickému efektu.

V této kapitole bylo uvedeno několik prací zabývajících se hydratací. Předložená diplomová práce je zaměřena na studium hydratace s využitím metody perfuzní kalorimetrie, kdy byla vlhkost ke vzorku přiváděna dvěma způsoby a oba způsoby byly vzájemně porovnány. Jedná se o techniku, kterou se mnoho autorů ve svých publikacích nezabývá. Zároveň je v diplomové práci studováno poměrně velké množství biokoloidů, tudíž může být provedeno vzájemné srovnání jejich hydratačních nebo sorpčních vlastností. Další metodou využitou k hydrataci byla metoda DSC, kde byly studovány biokoloidní látky při jejich okamžitém smíchání s vodou a po dlouhodobějším působení vody na jejich strukturu. Tento typ experimentů pomocí DSC není rovněž moc publikován. Cílem této práce je tudíž studované metody zhodnotit a pokusit se je dále optimalizovat.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité biokoloidy

Jako zástupci huminových látek byly vybrány huminové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK) izolované z řeky a z rašeliny. Všechny huminové látky jsou od společnosti International Humic Substances Society (IHSS). Huminové látky pocházejí z řeky Suwannee River (HK a FK Suwannee River) a rašelina z Pahokee (HK a FK Pahokee Peat). Jejich vzhled je znázorněn na Obr. 10.

- FK Suwannee River; 2S101F
- HK Suwannee River; 2S101H
- FK Pahokee Peat; 2S103F
- HK Pahokee Peat; 1S103H



Obr. 10: a) FK Suwannee River, b) HK Suwannee River, c) FK Pahokee Peat, d) HK Pahokee Peat

Hyaluronan sodný byl vybrán ve třech různých molekulových hmotnostech a byl získán od společnosti Contipro Biotech s.r.o.

- Hyaluronan sodný 130 – 300 kDa; č.š. 213-6213
- Hyaluronan sodný 500 – 750 kDa; č.š. 213-4245
- Hyaluronan sodný 1 500 – 1 750 kDa; č.š. 160218-E1

Ostatní biokoloidní látky:

- Chitosan 168 kDa; č.š. MKBH 7256V; Sigma-Aldrich s.r.o.
- Dextran z *Leuconostoc Mesenteroides*; mol. hm. 425-575; č.š. D1037-506; Sigma-Aldrich s.r.o.

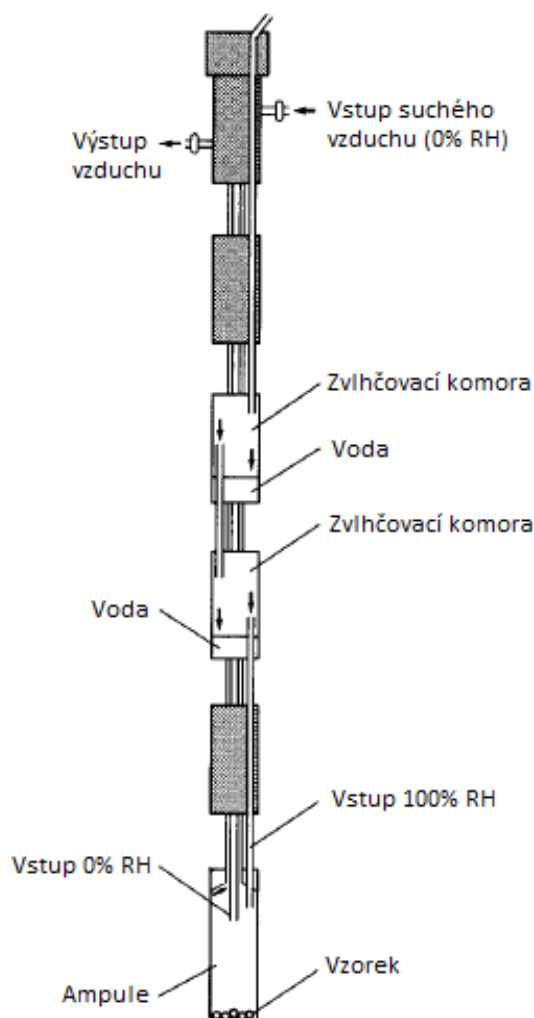
3.2 Použité přístroje

- Termogravimetrická analýza – termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 (TA Instruments)
- Perfuzní kalorimetrie – izotermický mikrokolorimetr TAM III (TA Instruments)
- Diferenční kompenzační kalorimetrie – mikrokolorimetr DSC Q2000 (TA Instruments)

3.3 Metody studia

3.3.1 Metoda perfuzní kalorimetrie

Perfuzní mikrokolorimetrie je metoda, při které probíhá měření v perfuzní cele, kdy do ampule se vzorkem proudí plynný dusík o definované relativní vlhkosti (RH). Dusík je ke vzorku přiváděn kapilárou přes zvlhčovací komoru obsahující destilovanou vodu. Vzduch proudící touto cestou tak odpovídá hodnotě 100 obj. % RH. Další cesta plynného dusíku přes zvlhčovací komorou neprochází a RH má tedy hodnotu 0 obj. %. Tok z obou kapilár se mísí v různých poměrech a hodnota relativní vlhkosti tak dosahuje požadované hodnoty. Schéma perfuzní cely je znázorněno na Obr. 11 [49].



Obr. 11: Schéma perfuzní cely [49]

Vlastní měření:

Před začátkem experimentu byly zvlhčovací komory v perfuzní cele naplněny pomocí injekční stříkačky destilovanou vodou. Na analytických vahách bylo naměřeno okolo 10 mg vzorku, kdy byla přesná hmotnost zaznamenána v programu. Ampule se vzorkem byla následně

zasunuta do perfuzní cely a cela byla umístěna do izotermického mikrokalořimetru TAM III od společnosti TA instruments. Proud dusíku byl přiváděn ke vzorku rychlostí 100 ml/h. Měření v kalorimetru probíhalo při laboratorní teplotě (22 °C). Relativní vlhkost byla ke vzorku přiváděna dvěma způsoby. Prvním způsobem byl kontinuální přívod RH, kdy byla hodnota 0 obj. % RH nastavena na čtyři hodiny, aby došlo ke stabilizaci. Poté byla relativní vlhkost ke vzorku přiváděna kontinuálně až po hodnotu 100 obj. % RH, a to po dobu tří dnů čili 72 hodin, aby byl zajištěn pomalý přívod vlhkosti a možnost sledování i malých změn vzorku při reakci s vodou. RH se poté ještě šest hodin udržovala na této maximální hodnotě.

Druhým způsobem byl krokový přívod RH. Experiment začínal na hodnotě 0 obj. % RH po dobu dvou hodin. Poté byla hodnota skokově změněna na 10 obj. % RH. Tato hodnota 10 obj. % relativní vlhkosti byla ke vzorku přiváděna opět po dobu dvou hodin a následně byla zvýšena na 20 obj. % RH. Tímto postupem se vlhkost měnila až do hodnoty 100 obj. % RH čili každý krok trval dvě hodiny a změna RH byla vždy s krokem 10 obj. %. Na hodnotě 100 obj. % RH se doba místo dvou hodin zvýšila na čtyři hodiny. Stejným způsobem bylo prováděno i snižování RH od 100 do 0 obj. % RH. Výstupem měření v kalorimetru byly signály tepelného toku při reakci vlhkosti se vzorkem.

3.3.2 Termogravimetrická analýza TGA

TGA je nejjednodušší metodou termické analýzy. Vzorek je vystaven tepelnému namáhání, a na citlivých mikrováhách je sledována změna jeho hmotnosti. Atmosféra, ve které měření probíhá, je buď inertní (dusík nebo argon) nebo oxidační (vzduch) [47].

Vlastní měření:

Měření probíhalo v termogravimetrickém analyzátoru TGA Q5000 od společnosti TA instruments. Čistý suchý vzorek biokoloidu byl vložen do platinové pánvičky. Měření probíhalo v inertní atmosféře dusíku od laboratorní teploty po teplotu 500 °C s krokem 10 °C za minutu. Naměřená data byla zaznamenávána v počítači, který byl propojen s použitým analyzátořem.

3.3.3 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC

Jedná se o jednu z nejrozšířenějších metod termické analýzy. Jsou při ní zkoumány tepelné vlastnosti vzorku vystaveného teplotnímu programu. Vzorek je ohříván nebo chlazen definovanou rychlostí spolu s kontrolním (referenčním) vzorkem. Signál související s fázovou změnou vzorku je způsoben momentální rozdílnou teplotou vzorku a vzorku referenčního, kterou se přístroj snaží okamžitě kompenzovat. [48] Fázová změna v materiálu je doprovázena buď uvolňováním (exotermická reakce) nebo spotřebouváním tepla (endotermická reakce). Tento typ procesu se v DSC experimentu detekuje jako pík. [49]

Vlastní měření:

Ke 20 mg vzorku biokoloidů byl přidán 1 ml destilované vody a vzorky s vodou byly intenzivně promíchány. Měření bylo prováděno v mikrokalořimetru DSC Q2000 od společnosti TA instruments. Vzorek s vysokým obsahem vody byl aplikován do hliníkových pánviček. Do cely v mikrokalořimetru byl přiváděn inertní dusík. Nejdříve docházelo ke chlazení vzorku od teploty 25 °C po teplotu -30 °C s teplotou chlazení 3 °C za minutu. Při této minimální hodnotě byl vzorek opět ohříván, a to po teplotu 20 °C opět s rychlostí ohřevu 3 °C za minutu. Vzorky biokoloidů s vodou byly měřeny při stejném nastavení a za stejných podmínek i po 24 hodinách po jejich smíchání a ponechání ve vodě v nádobě přikryté víčkem, přičemž k měření byl vždy použit vzorek nový. Do počítače propojeného s přístrojem byl zaznamenáván signál tepelného toku vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Perfuzní kalorimetrie

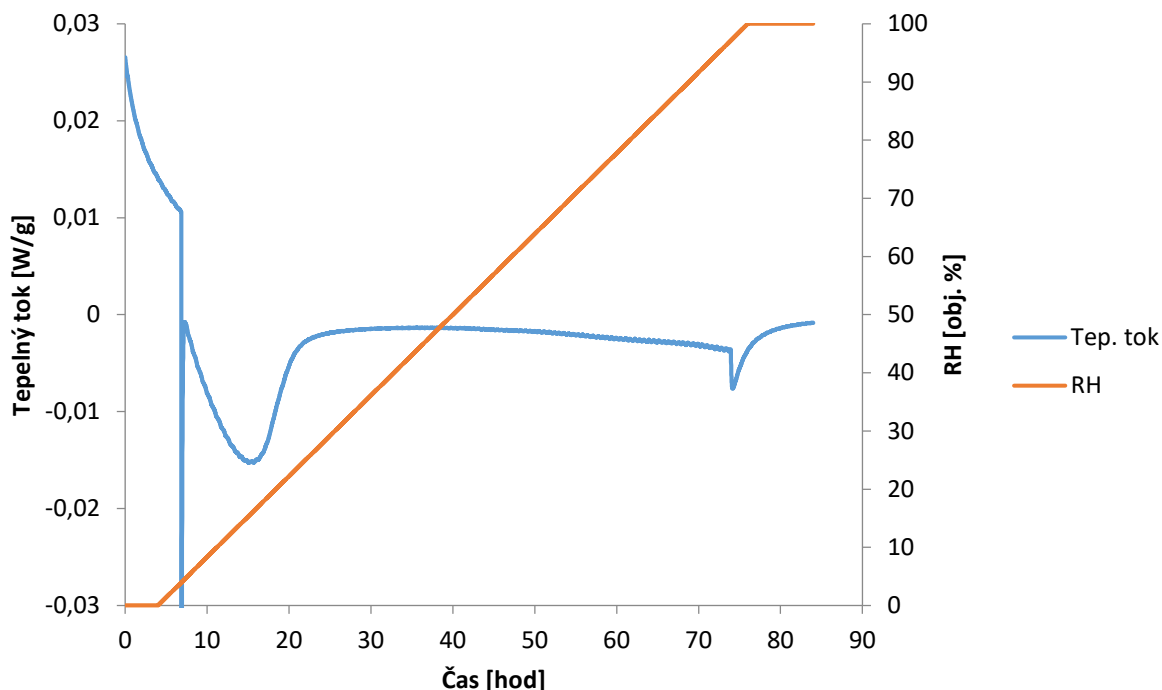
Pro studium hydratace byla využita metoda perfuzní kalorimetrie. Studovány byly vybrané biokoloidy – huminové kyseliny Pahokee Peat (HK PP), huminové kyseliny Suwannee River (HK SR), fulvinové kyseliny Pahokee Peat (FK PP), fulvinové kyseliny Suwannee River (FK SR), hyaluronan o molekulové hmotnosti 130 – 300 kDa (HYAL 130 – 300), 500 – 750 kDa (HYAL 500 – 750) a 1500 – 1750 kDa (HYAL 1 500 – 1 750), chitosan a dextran.

Na Obr. 12 a Obr. 13 jsou znázorněny křivky tepelného toku vzorků FK Pahokee Peat získané touto metodou.

Vlhkost byla ke vzorku přiváděna dvěma způsoby. Prvním způsobem byl kontinuální přívod relativní vlhkosti. RH byla ke vzorku přiváděna od 0 obj. % lineárně až do 100 obj. % RH. Nejdříve byla RH nastavena po dobu 4 hodin na hodnotu 0 obj. % kvůli stabilizaci. Následně byla zvyšována až po maximální hodnotu 100 obj. % RH, a to po dobu 72 hodin, aby i malá změna RH byla pozorovatelná na křivce tepelného toku. Na hodnotě 100 obj. % RH byla tato maximální hodnota udržována ještě po dobu šesti hodin.

Křivky tepelného toku všech měřených biokoloidů vykazují stejný trend. K reakci vzorku s přiváděnou vlhkostí došlo asi po 7 hodinách při hodnotě 4,5 obj. % RH, kdy došlo k velkému skoku křivky tepelného toku do nižších hodnot. Následně je od této hodnoty RH pozorován pík, který tedy odpovídá sorpci vlhkosti do struktury vzorku. Tento pík je v experimentu zásadní, protože právě ten se u každého vzorku liší v závislosti na jeho struktuře a vlastnostech. Při určité hodnotě RH dochází ke stabilizaci křivky tepelného toku, která je v podstatě konstantní a ustaluje se u hodnoty asi 0 W/g. Při hodnotě 100 obj. % RH je ve všech grafech pozorován další pík, ten je však pravděpodobně reakcí na změnu v přivádění RH.

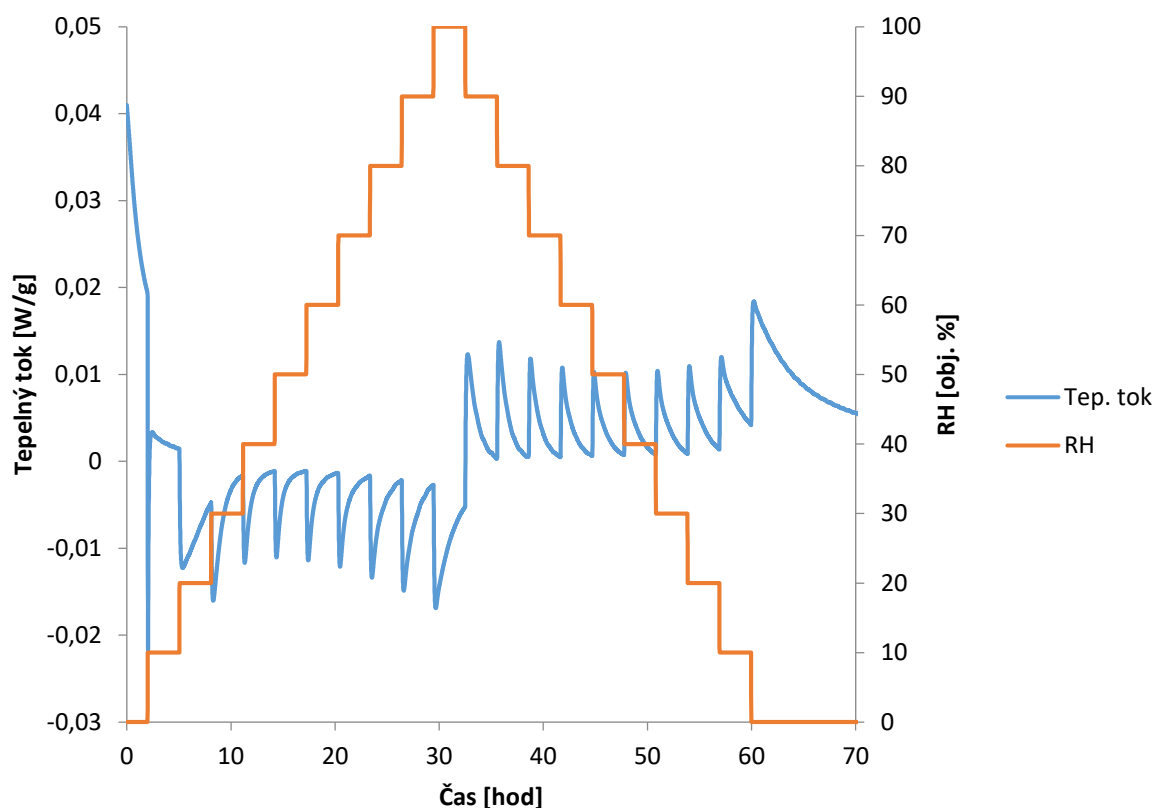
Na Obr. 12 je pro příklad znázorněna křivka tepelného toku FK Pahokee Peat, kdy k ustálení křivky tepelného toku došlo asi po 26 hodinách při hodnotě 29 obj. % RH.



Obr. 12: Tepelný tok FK PP při kontinuálním přívodu RH

Druhým způsobem přivádění RH ke vzorku byl krokový přívod. RH byla přiváděna od 0 do 100 obj. % RH vždy s krokem 10 obj. %. Následně byla hodnota RH z hodnoty 100 obj. % opět s krokem 10 obj. % snižována až na hodnotu 0 obj. % RH. Křivky tepelného toku všech měřených vzorků opět vykazují stejný trend. S každým krokovým zvýšením RH od 0 do 100 obj. % dochází vždy ke skokovému snížení křivky tepelného toku. Při přivádění RH na určité konstantní hodnotě (po dobu dvou hodin), dochází opět k růstu křivky, která se přibližuje k hodnotě 0 W/g. Při snižování RH ze 100 do 0 obj. % docházelo naopak ke skoku křivky tepelného toku vždy do vyšších hodnot. Při konstantní hodnotě RH se hodnoty křivky toku snižovaly a přibližovaly se opět k hodnotě 0 W/g. Všechny tyto skoky se vykreslily jako pravidelné píky. Při reakci vzorku s vlhkostí docházelo ke změně pravidelnosti píků a tyto píky tak mají odlišný průběh.

Na Obr. 13 je křivka tepelného toku vzorku FK Pahokee Peat při krokovém přivádění RH. Při prvním zvýšení RH na 10 obj. % je pozorován velký skok křivky tepelného toku do nižších hodnot, jako tomu bylo i u kontinuálního přivádění RH při hodnotě 4,5 obj. %. Ke skokovému snížení křivky v tomto případě dochází při hodnotě 10 obj. % RH u všech vzorků. Průběh křivky při vyšších hodnotách RH se pak liší pro každý vzorek. Reakci vzorku na vlhkost můžeme u této fulvinové kyseliny pozorovat při 10 až 30 obj. % RH. Ve vyšších hodnotách není reakce na vlhkost již znatelná. Tento výsledek je ve shodě s předchozím způsobem přivádění RH, kdy k ustálení křivky tepelného toku FK PP došlo asi při 29 obj. % RH a reakce vzorku s vlhkostí tedy probíhala od 4,5 do 29 obj. % RH.



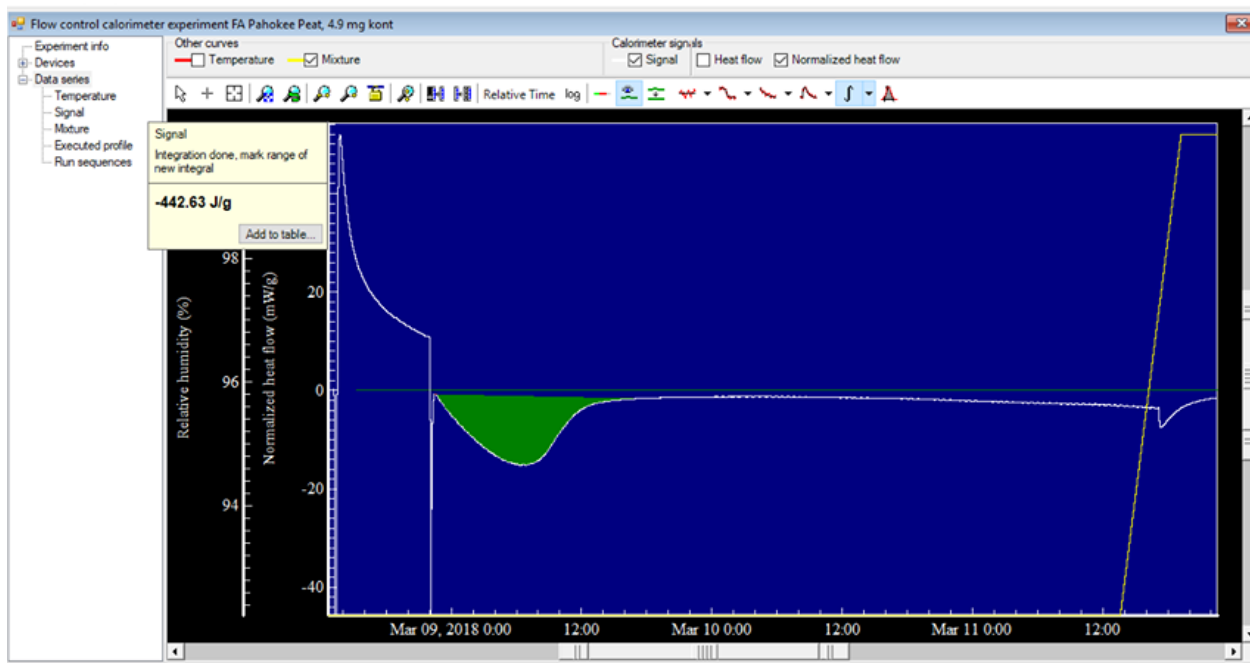
Obr. 13: Tepelný tok FK PP při krokovém přivádění RH

Obr. 14 ukazuje, jak vypadal původní bílý práškový vzorek dextranu před měřením metodou perfuzní kalorimetrie (vlevo) a po měření (vpravo). Po navázání vody na strukturu dextranu došlo ke splnutí jednotlivých částic a ke ztvrdnutí struktury dextranu. Působením vody došlo pravděpodobně k tvorbě krystalických oblastí v jeho struktuře a k vytvoření kompaktního celku. Stejné chování bylo pozorováno u všech ostatních zkoumaných biokoloidů, které jsou ve vodě rozpustné. Vzorky ve vodě nerozpustné byly po skončení měření a vyjmutí z cely vizuálně ve stejném stavu jako před začátkem měření, to se tedy týká nerozpustných vzorků HK a chitosanu.



Obr. 14: Dextran vlevo před měřením, vpravo po měření v perfuzní cele

Pro získání tepla reakce vznikající při reakci vlhkosti se vzorkem byla provedena integrace plochy píku, který se u všech vzorků lišil. Integrovány byly píky křivek tepelných toků při kontinuálním přivádění RH. Integrace byla provedena v softwaru TAM Assistant, jak je znázorněno na Obr. 15. V Tab. 2 jsou pak uvedena tepla píků – tepla reakce všech vzorků.



Obr. 15: Příklad integrace píku FK PP v TAM Assistant

Tab. 2: Tepla píků a ustálení křivky tepelného toku při kontinuálním a krokovém přivádění RH jednotlivých biokoloidů

| | Kontinuálně | | | Krokově |
|----------------|--------------------------------|-------------|-----------|-------------|
| | Ustálení křivky tepelného toku | | | |
| Vzorek | Teplo píku (J/g) | RH (obj. %) | čas (hod) | RH (obj. %) |
| FK PP | 443 | 29 | 25 | 30 |
| FK SR | 634 | 37 | 30 | 30-40 |
| HK PP | 22 | 17 | 16 | 10 |
| HK SR | 53 | 28 | 24 | 30 |
| HYAL 130-300 | 757 | 42 | 35 | 40 |
| HYAL 500-750 | 1517 | 44 | 36 | 40 |
| HYAL 1500-1700 | 785 | 39 | 32 | 40 |
| Chitosan | 194 | 35 | 29 | 20-30 |
| Dextran | 748 | 47 | 37 | 40-50 |

V Tab. 2 je uvedeno ustálení křivky tepelného toku při hodnotě RH a u kontinuálního přívodu RH je také uvedeno ustálení křivky v čase. V obou způsobech přivádění vlhkosti docházelo k reakci mezi molekulami vody a vzorkem při zhruba stejných hodnotách RH. Oba způsoby přívodu RH ke vzorku v metodě perfuzní kalorimetrie se tedy shodují a jeví se jako vhodné pro studium hydratace.

Jak je také napsáno v Tab. 2, nejvíce tepla při reakci s vlhkostí bylo uvolněno při reakci s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 500 – 750 kDa. Při experimentu s nízkomolekulovým (HYAL 130 – 300) a vysokomolekulovým (HYAL 1 500 – 1 750) bylo tepla uvolněno téměř stejně a v porovnání s HYAL 500 – 750 méně. Bylo očekáváno, že při reakci s HYAL s nejvyšší molekulovou hmotností bude tepla uvolněno nejvíce, tedy že s rostoucí molekulovou hmotností poroste i teplo reakce. Tento trend byl totiž zjištěn v bakalářské práci [50], kde byl studován HYAL o molekulové hmotnosti 300 kDa a 1 400 – 1 600 kDa. Zde bylo uvolněné teplo reakce HYAL o vyšší molekulové hmotnosti v porovnání s HYAL o nižší molekulové hmotnosti mnohem vyšší. Nicméně v této diplomové práci byly studovány hyaluronany s jinou šarží a HYAL 1 500 – 1 750 byl uchováván již delší dobu a mohlo tak dojít k jeho degradaci. Proto po zjištění těchto výsledků bylo dohledáno, že byla nedávno provedena analýza molekulové hmotnosti HYAL 1 500 – 1 750, při níž bylo prokázáno, že opravdu došlo k jejímu snížení. Molekulová hmotnost byla stanovena asi na 880 kDa. Molekulová hmotnost je tedy nižší, než bylo původně předpokládáno, avšak v práci se bude nadále uvádět jeho molekulová hmotnost 1 500 – 1 700 kDa, se kterou byl HYAL vybrán a která měla být studována. I přes to je však 880 kDa nadále nejvyšší molekulovou hmotností hyaluronanu v této práci.

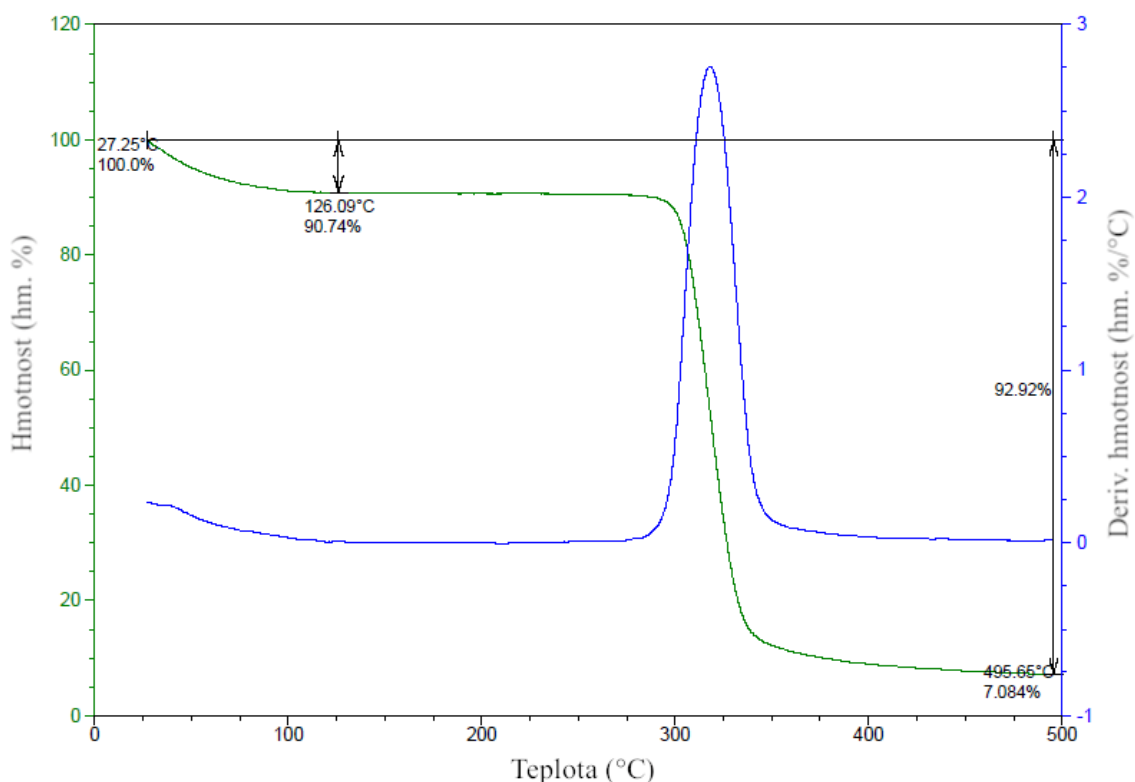
Pokud se vrátíme k teplům píků v Tab. 2, tak k nejmenšímu uvolnění tepla došlo při reakci vlhkosti s huminovými kyselinami, dále pak s chitosanem. Tyto biokoloidy jsou ve vodě nerozpustné a dokáží na sebe navázat nejméně vody ze všech studovaných biokoloidů. Z Tab. 2 lze také vyčíst, že HK a FK pocházející z řeky (Suwannee River) vykazují vyšší hodnoty tepel píků, než je tomu u HK a FK pocházejících z rašeliny (Pahokee Peat). Zároveň HK a FK Suwannee River reagují s vlhkostí delší dobu než HL Pahokee Peat. Tyto výsledky odpovídají předpokladu, že HL pocházející z vody jsou bohatší na skupiny obsahující kyslík – karboxylové a fenolické, jak uvádí E. S. Rigobello a kol. ve studii [51]. Jak již bylo v této diplomové práci uvedeno, tyto funkční skupiny jsou schopné vázat na sebe molekuly vody, proto HK a FK Suwannee River vykazují lepší hydratační vlastnosti než HK a FK Pahokee Peat.

Dextran je znám svými výbornými hydratačními vlastnostmi, protože obsahuje mnoho hydrofilních hydroxylových skupin a je ve vodě rozpustný. Proto výsledek, kdy vzorek dextranu reagoval s přiváděnou vlhkostí nejdéle ze studovaných biokoloidů – po dobu 37 hodin, kdy se křivka tepelného toku ustálila na hodnotě 47 obj. % RH, odpovídá tomuto faktu o jeho hydratačních vlastnostech.

4.2 Termogravimetrická analýza TGA

Všechny vzorky biokoloidů byly podrobeny termogravimetrické analýze. Na Obr. 16 je znázorněn záznam z TGA analýzy dextranu, přičemž byl vzorek ohříván z laboratorní teploty po teplotu 500 °C.

Na ose y je znázorněna hmotnost vzorku, kdy hodnota 100 hm. % značí hmotnost původního vzorku. Při zvyšování teploty dochází k úbytku hmotnosti. První úbytek značí odpaření vody, proto je z tohoto úbytku hmotnosti určena původní vlhkost všech látek. Při vyšší teplotě je křivka v určitém tepelném rozmezí stabilní a další úbytek značí degradaci vzorku a jeho spalování.



Obr. 16: Příklad TGA křivky dextranu

Přehled původních vlhkostí všech vzorků získaných metodou TGA je uveden v Tab. 3. Dále jsou zde pro přehled uvedeny i teploty, při kterých začalo docházet k degradaci vzorku.

Tab. 3: Termogravimetrická analýza všech vybraných biokoloidů

| Vzorek | Původní vlhkost (hm. %) | Začátek degradace (°C) |
|------------------|-------------------------|------------------------|
| HK PP | 9,0 | 160 |
| HK SR | 7,7 | 150 |
| FK PP | 9,6 | 150 |
| FK SR | 7,5 | 150 |
| HYAL 130 – 300 | 8,0 | 210 |
| HYAL 500 – 750 | 9,4 | 210 |
| HYAL 1500 – 1750 | 13,0 | 210 |
| Chitosan | 8,6 | 260 |
| Dextran | 9,3 | 300 |

Jak vyplývá z Tab. 3, nejvyšší procentuální obsah původní vlhkosti (13 hm. %) vykazuje suchý vzorek HYAL 1 500 – 1 750. Všechny ostatní vzorky měly původní vlhkosti v rozmezí od 7,5 do 9,6 hm. %. Nejvyšší původní vlhkost hyaluronanu o největší molekulové hmotnosti může být také důvodem, proč bylo při metodě perfuzní kalorimetrie u tohoto vzorku hyaluronanu zjištěno menší teplo reakce, než u HYAL 500 – 750 o menší molekulové hmotnosti (viz Tab. 2 v kapitole 4.1). Protože už původně obsahoval HYAL 1 500 – 1 750 nejvíce vody, nemusel být proto schopný při experimentu navázat tak velké množství vlhkosti jako HYAL 500 – 750 s nižší molekulovou hmotností, ale s menším původním obsahem vlhkosti.

4.3 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC

Další metodou využitou ke studiu hydratace byla metoda DSC. Na Obr. 17 a Obr. 18 jsou grafické výsledky této metody, kdy byl k 20 mg biokoloidní látky přidán 1 ml vody. Data jsou získána ihned po jejich smíchání a dále po 24 hodinách od smíchání biokoloidu s vodou.

Výstupem měření jsou tedy záznamy DSC, vyjadřující tepelný tok jako funkci teploty. V záznamech se vyskytují dva píky – exotermní a endotermní. Nejdříve dochází při ochlazování vzorku do teploty $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ k vykreslení exotermního píku směrem nad základní linii. Exotermní pík odpovídá tuhnutí a krystalizaci a při tomto fázovém přechodu je uvolněna energie. Při následném oteplování vzorku se v záznamu objevuje pík endotermní směřující pod základní linii. Ten se připisuje tání vzorku a energie je při této reakci spotřebována. Plocha píku je pak přímo úměrná teplu uvolněnému nebo spotřebovanému při reakci a výška píku je přímo úměrná rychlosti změny teploty reakce.

Voda v těsné blízkosti biokoloidu přítomná v pórech nebo vázaná polárními skupinami je nemrznoucí, a proto nevykazuje žádnou krystalizaci, ani tání při chlazení a zahřívání. Tato vázaná nemrznoucí voda proto nemůže být pomocí DSC detekována [52]. Píky krystalizace a

tání v záznamu DSC odpovídají tedy volné vodě nevázané na vzorek. I proto byl při experimentu zvolen systém s vysokým obsahem vody.

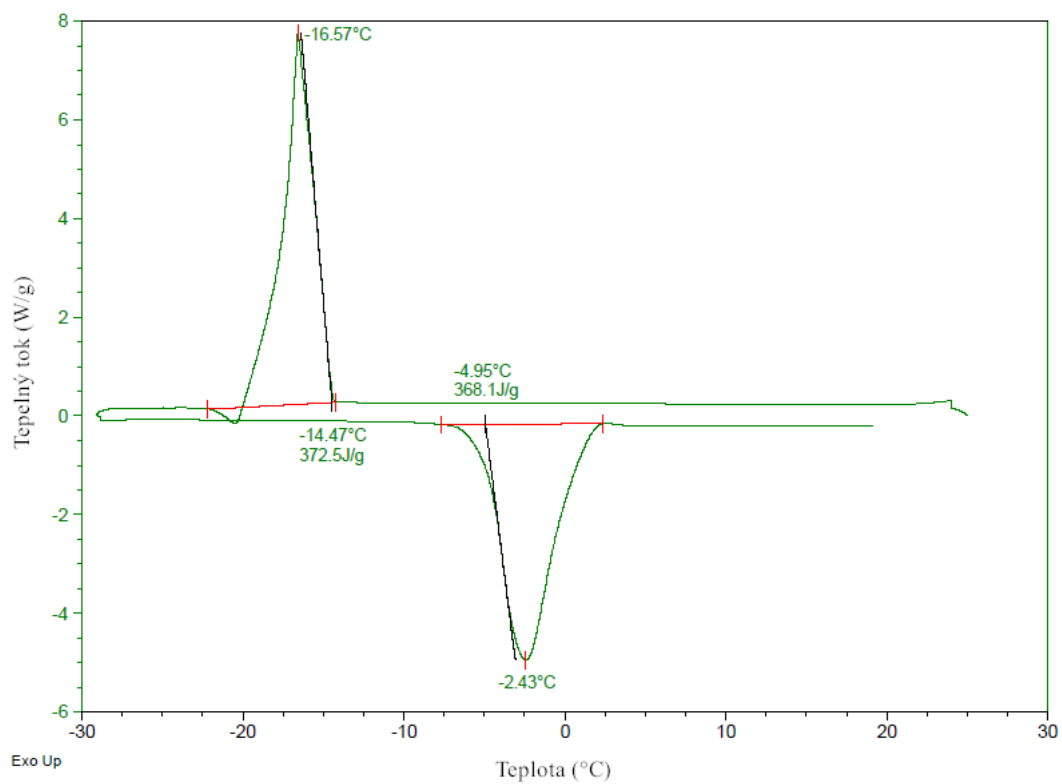
Pro studium hydratace je v práci vyhodnocen exotermní pík odpovídající krystalizaci i endotermní pík připisující se tání. Po 24 hodinách může docházet ke změnám teplot onsetu, což je teplota, kdy začíná docházet k ději – ke krystalizaci a k tání vzorku. Onset se vyznačuje jako náběh píku. Zároveň může docházet ke změnám entalpií tání a krystalizace. Teploty tání a krystalizace odpovídají v záznamu DSC vrcholům píků. Všechny tyto změny po 24 hodinách jsou zapříčiněny změnou v systému biokoloid/voda, kdy nejpravděpodobněji dochází ke změnám u molekul vody podílejících se na hydrataci vzorku.

Na Obr. 17 je DSC záznam vzorku HYAL 130 – 300 ihned po smíchání s vodou. Na Obr. 18 je pak záznam, kdy byl HYAL 130 – 300 s vodou měřen po 24 hodinách. Plocha exotermního píku směřujícího nad základní linii neboli entalpie připisující se krystalizaci volné vody v systému byla ihned po smíchání vzorku s vodou stanovena na 373 J/g. Po 24 hodinách byla naměřena entalpie 193 J/g. Došlo tedy k velkému snížení této hodnoty. Teplota onsetu byla nejdříve stanovena na $-14,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tuhnutí na $-16,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 24 hodinách došlo ke snížení teplot – teplota onsetu měla hodnotu $-18,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vrchol píku odpovídal hodnotě $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. V Experimentu [52] bylo stanoveno, že při zvyšování volné vody v systému byl v DSC záznamu exotermní pík posunut k vyšším teplotám a zároveň docházelo k jeho zúžení a zvýšení intenzity. Snížení teploty krystalizace u vzorky HYAL 130 – 300 po 24 hodinách je tedy výsledkem menšího obsahu volné vody, u které došlo ke krystalizaci.

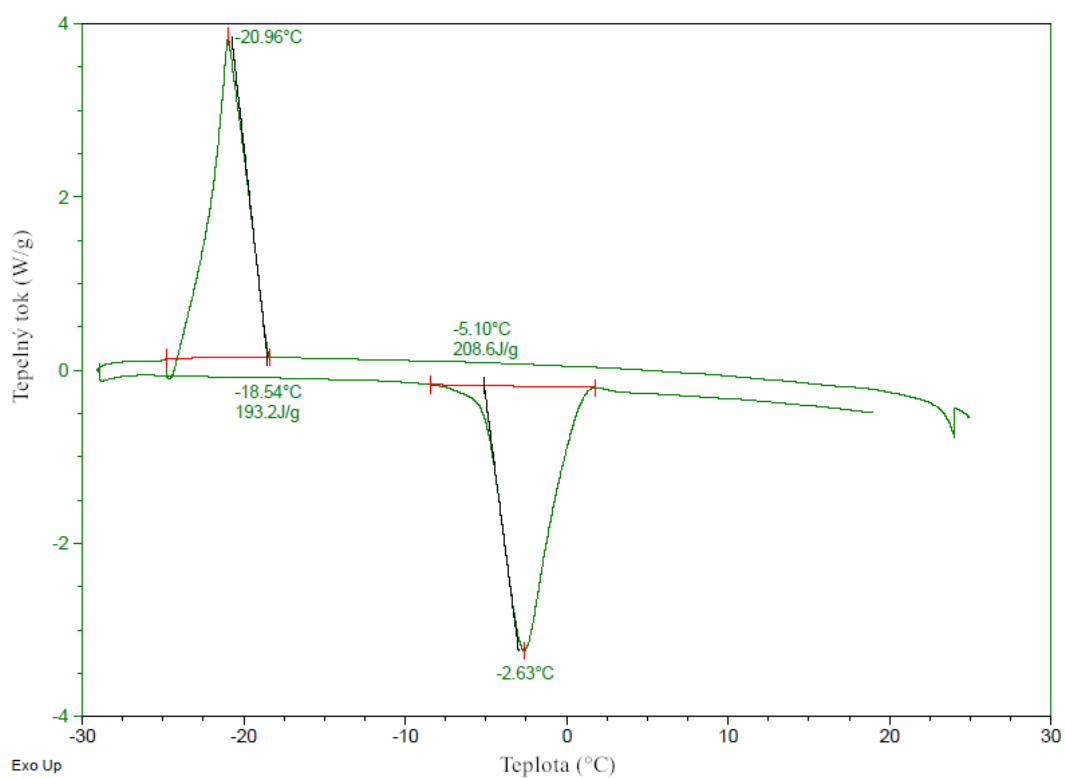
Plocha endotermního píku neboli entalpie tání vody v systému biokoloid/voda měla po 24 hodinách taktéž nižší hodnotu. Entalpie tání se snížila z hodnoty 368 J/g na hodnotu 209 J/g. K tání vzorku tedy bylo po 24 hodinách zapotřebí menší energie. Teplota onsetu a teplota tání volné vody byly po 24 hodinách taktéž nižší. Pokles teplot se připisuje vyššímu stupni hydratace látky, k čemuž podle těchto výsledků po 24 hodinách došlo. Snížení entalpie tání značí větší množství vázané nemrznoucí vody, která není detekována, a tudíž větší množství volné vody, která je schopná fázového přechodu.

V kapitole 2.6.3 byl popsán experiment s využitím DSC, kdy byly tepelnému namáhání podrobeny chitosanové filmy s různým přídatkem vody. Z Obr. 9 můžeme vyčíst, že s rostoucím objemem vody docházelo ke zvětšování endotermního píku odpovídajícímu tání. Tohle bylo prokázáno např. i v práci [52], kde byly DSC podrobeny vybrané polysacharidy s různým obsahem vody. Pokud srovnáme oba píky na Obr. 17 a Obr. 18, po 24 hodinách došlo ke snížení jejich intenzit. I tento poznatek odpovídá tvrzení, které již bylo uvedeno v předchozích odstavcích. Po 24 hodinách došlo k tvorbě nových vazeb mezi vodou a hyaluronanem, a tudíž k navázání více vody do struktury hyaluronanu a vzniklo tedy více vody podílející se na hydrataci. Volné vody se po 24 hodinách proto v systému nacházelo méně a výsledkem byl záznam menšího píku.

Všechny uvedené poznatky tedy potvrzují, že během 24 hodin došlo u vzorku HYAL 130 – 300 k navázání více vody do jeho struktury a tedy k větší hydrataci.



Obr. 17: HYAL 130-300 ihned po smíchání s vodou



Obr. 18: Obr. 19: HYAL 130-300 po 24 hodinách

V Tab. 4 jsou výsledky získané metodou DSC. Jsou zde uvedeny entalpie exotermních píků všech vzorků, které odpovídají krystalizaci vody a spotřebované energii při fázovém přechodu. Energie entalpie byla získána integrací plochy tohoto píku. Dále se v Tab. 4 nachází teploty, kdy začalo docházet ke krystalizaci (T_{onset}), a teploty krystalizace (T_k).

Tab. 4: Vyhodnocení exotermních píků v záznamu DSC: Entalpie exotermních píků – krystalizace (Entalpie), teploty počátku krystalizace (T_{onset}) a teploty krystalizace (T_k) ihned po smíchání vzorku s vodou a po 24 hodinách ve vodě

| | Ihned po smíchání s vodou | | | Po 24 hodinách | | |
|--------------------|---------------------------|-------------------------|------------|----------------|-------------------------|------------|
| Vzorek | Entalpie (J/g) | T_{onset} (°C) | T_k (°C) | Entalpie (J/g) | T_{onset} (°C) | T_k (°C) |
| HK PP | 299 | -16,4 | -18,7 | 292 | -15,6 | -17,9 |
| HK SR | 317 | -12,2 | -14,4 | 328 | -10,9 | -13,0 |
| FK PP | 327 | -14,4 | -16,7 | 315 | -15,8 | -17,8 |
| FK SR | 300 | -14,8 | -17,0 | 334 | -15,5 | -17,6 |
| HYAL 130 – 300 | 373 | -14,5 | -16,6 | 193 | -18,9 | -21,0 |
| HYAL 500 – 750 | 286 | -19,2 | -21,5 | 276 | -9,3 | -11,6 |
| HYAL 1 500 – 1 750 | 288 | -19,2 | -21,5 | 304 | -18,0 | -20,2 |
| Chitosan | 292 | -15,2 | -17,4 | 282 | -17,3 | -19,6 |
| Dextran | 317 | -15,2 | -17,4 | 319 | -16,0 | -18,3 |

Z Tab. 4 můžeme vyčíst, že u některých vzorků biokoloidů s vysokým obsahem vody došlo po 24 hodinách k poměrně velké změně všech hodnot teplot onsetu a krystalizace i entalpií krystalizace včetně již popsaného vzorku HYAL 130 – 300, kdy byla změna největší. U některých vzorků však ke změně po 24 hodinách nedošlo. To by znamenalo, že po 24 hodinách nenastala změna v obsahu volné vody a nedošlo tedy k vyššímu stupni hydratace látky. Maximální hydratace v těchto případech tudíž pravděpodobně mohla proběhnout okamžitě po smíchání vzorku s vodou nebo byla změna v hydrataci tak malá, že po 24 hodinách nebyl v DSC záznamu zaznamenán rozdíl.

V některých případech se naopak hodnoty entalpie a hodnoty teplot zvětšily. Vysvětlením by mohla být změna ve struktuře biokoloidu, způsobená velkým množstvím vody v systému. Časem mohlo dojít k zániku některých vazeb, ke změnám v uspořádání řetězců nebo u některých vzorků mohlo dojít např. k agregaci a molekuly vody vázané na strukturu tak mohly být vyloučeny. Tím by se vysvětlovala možná přítomnost většího množství volné vody po 24 hodinách. Nicméně pro úplné objasnění je nezbytné se věnovat této problematice v dalších výzkumech. Všechny metody využití v této práci lze např. zkombinovat. V metodě perfuzní kalorimetrie lze v místech, kde dochází k nějaké změně, zastavit přívod RH a vzorek může být následně podroben DSC. V těchto místech lze provést i analýzu TGA, kdy může být určena hmotnost navázané vody – vlhkosti.

Vyhodnocení endotermních píků ze záznamu DSC je uvedeno v Tab. 5. Vyhodnocení píků tání bylo stejné jako u exotermních píků. Jsou zde tedy entalpie, které odpovídají tání a uvolněné energii při fázovém přechodu vody, teploty počátku tání (T_{onset}) a teploty tání (T_t).

Tab. 5: Vyhodnocení endotermních píků v záznamu DSC: Entalpie endotermních píků – tání (entalpie), teploty počátku tání (T_{onset}) a teploty tání (T_t) ihned po smíchání vzorku s vodou a po 24 hodinách ve vodě

| | Ihned po smíchání s vodou | | | Po 24 hodinách | | |
|-----------------|---------------------------|------------------|------------|----------------|------------------|------------|
| Vzorek | Entalpie (J/g) | T_{onset} (°C) | T_t (°C) | Entalpie (J/g) | T_{onset} (°C) | T_t (°C) |
| HK PP | 332 | -4,1 | -2,1 | 317 | -4,3 | -2,0 |
| HK SR | 331 | -4,2 | -2,3 | 331 | -4,5 | -2,1 |
| FK PP | 339 | -5,0 | -2,6 | 327 | -4,4 | -2,4 |
| FK SR | 314 | -4,3 | -2,4 | 348 | -4,6 | -2,5 |
| HYAL 130 – 300 | 368 | -5,0 | -2,4 | 209 | -5,1 | -2,6 |
| HYAL 500 – 750 | 320 | -4,9 | -2,6 | 269 | -5,0 | -2,4 |
| HYAL1500 – 1750 | 312 | -5,1 | -2,9 | 314 | -5,2 | -3,1 |
| Chitosan | 343 | -4,6 | -2,7 | 341 | -4,5 | -2,3 |
| Dextran | 302 | -4,5 | -2,6 | 306 | -4,6 | -2,3 |

Stejně jako u krystalizace i u tání došlo po 24 hodinách ke změně hodnot entalpií a teplot tání jen u některých vzorků, jak je uvedeno v Tab. 5. Největší rozdíly byly zaznamenány u HYAL 130 – 300 a dále u HYAL 500 – 750. Po 24 hodinách u nich byly naměřeny nižší energie entalpie. To by značilo největší rozdíl v obsahu volné vody při měření ihned a po 24 hodinách. Změny entalpií znamenají největší intenzitu tvorby nových vazeb mezi hyaluronanem a vodou v tomto časovém úseku ze všech zkoumaných biokoloidů.

U některých vzorků však změny po 24 hodinách opět nebyly zaznamenány, což by taktéž nasvědčovalo maximální hydrataci ihned po smíchání s vodou.

Pokud porovnáme vzájemně změny v teplotách krystalizace a tání, k větším posunům teplot došlo většinou u exotermního píku při krystalizaci.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá studiem hydratace vybraných biokoloidních látek. V experimentální části byla využita metoda perfuzní kalorimetrie, kdy byla ke vzorku přiváděna kontrolovaná relativní vlhkost dvěma způsoby – kontinuálně a krokově. K reakci začalo docházet u všech biokoloidů při stejné hodnotě RH. Doba reakce vzorku s vlhkostí se pak u každého biokoloidu lišila. Srovnáním obou způsobů přivádění vlhkosti ke vzorku bylo zjištěno, že reakce mezi molekulami vody a vzorkem probíhala při zhruba stejných hodnotách relativní vlhkosti. Oba způsoby se tedy ukázaly jako spolehlivé při zkoumání sorpčních vlastností biokoloidů či biopolymerů.

Dále byla provedena termogravimetrická analýza TGA, díky které byly stanoveny původní vlhkosti všech vzorků. Původní vlhkosti mohou mít s největší pravděpodobností zásadní vliv na sorpční vlastnosti biokoloidů. Jak bylo zjištěno, vzorek s nejvyšším obsahem původní vlhkosti měl v metodě perfuzní kalorimetrie nižší teplo reakce, než bylo očekáváno. Jednalo se o vzorek hyaluronanu s nejvyšší molekulovou hmotností, kdy se předpokládalo, že schopnost vázat vodu se zvyšuje s rostoucí molekulovou hmotností, čímž se ukázalo, že původní vlhkosti vzorků nelze při sorpčních experimentech zanedbat.

Poslední metodou využitou v diplomové práci byla diferenční kompenzační kalorimetrie. Oproti metodě perfuzní kalorimetrie, byly pomocí DSC studovány vzorky s vysokým obsahem vody. Skeny DSC byly provedeny ihned po smíchání biokoloidů s vodou a po 24 hodinách po jejich smíchání. Byly vyhodnocovány entalpie krystalizace a tání volné vody v systému a dále teploty krystalizace a tání. Po 24 hodinách byly v některých případech zjištěny změny, které způsobila voda reagující se vzorkem biokoloidu a tudíž se potvrdila tvorba nových vazeb mezi molekulami vody a biokoloidy během zkoumaného časového úseku 24 hodin. Největší rozdíly byly zaznamenány u vzorků hyaluronanu.

Porozumění hydratačním vlastnostem látek je velice důležité, neboť nám může poskytnout informace, které mohou přispět při jejich aplikacích v mnoha oborech. Problematikou hydratace je nezbytné se věnovat v dalších výzkumech, tato diplomová práce tvoří základ, který musí být dále prozkoumán. V metodě perfuzní kalorimetrie se lze např. zabývat sledováním vlivu rychlosti přivádění relativní vlhkosti na sorpční vlastnosti látek. Metodou DSC pak mohou být provedeny experimenty po 24 hodinách po smíchání biokoloidu s vodou s různým obsahem vody. Dále může být prozkoumán vliv po smíchání dříve, i po delším čase, než je 24 hodin. Všechny metody lze také navzájem kombinovat. Je tedy mnoho možností, jak se studiem hydratace pomocí těchto technik pokračovat.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BURSÁKOVÁ, Petra. *Hydration of Humic Substances = hydratace huminových látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 98 l. : il. Vedoucí práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [2] HATAKEYAMA, Hyoe a Tatsuko HATAKEYAMA. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta*. Elsevier B.V, 1998, **308**(1), 3-22. ISSN 00406031.
- [3] GROSSUTTI, Michael, John R DUTCHER a Michael GROSSUTTI. Correlation Between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides. *Biomacromolecules*. 2016, **17**(3), 1198-1204. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00026.
- [4] HUNGER, Johannes, Anja BERNECKER, Huib j. BAKKER, Mischa BONN a Ralf p. RICHTER. Hydration Dynamics of Hyaluronan and Dextran. *Biophysical Journal*. Elsevier Inc, 2012, **103**(1), 10-12. ISSN 00063495.
- [5] KUREK, M., A. GUINAULT, A. VOILLEY, K. GALIĆ a F. DEBEAUFORT. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry*. 2013, **144**, 9-17. ISSN 03088146.
- [6] QIAO, C., X. MA, J. ZHANG a J. YAO. Effect of hydration on water state, glass transition dynamics and crystalline structure in chitosan films. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2019, **206**, 602-608. ISSN 01448617.
- [7] STEINBÜCHEL, A a M HOFRICHTER. *Biopolymers. Volume 1, Lignin, humic substances and coal*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 513 s. ISBN 3-527-30220-4.
- [8] VESELÁ, L., M. KUBAL, J. KOZLER a P. INNEMANOVÁ. Structure and properties of natural humic substances of the oxyhumolite type. *Chemické Listy*. Czech Society of Chemical Engineering, 2005, **99**(10), 711-717. ISSN 00092770.
- [9] CIHLÁŘ, Zdeněk. *Retence vody v huminových kyselinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2009. Vedoucí práce Ing. JIŘÍ KUČERÍK, Ph.D.
- [10] DE MELO, Bruna alice gomes, Fernanda lopes MOTTA a Maria helena andrade SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science & Engineering C*. Elsevier B.V, 2016, **62**, 967-974. ISSN 0928-4931.

- [11] GUO, Xiao-xia, Hong-tao LIU a Shu-biao WU. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V, 2019, **662**, 501-510. ISSN 0048-9697.
- [12] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, **104**(11), 1015-1022.
- [13] BARSOVA, Natalia, Galina MOTUZOVA, Ksenia KOLCHANOVA a Andrei STEPANOV. The effect of humic substances on Cu migration in the soil profile. *Chemistry and Ecology*. 2019, **35**(1), 86-101. DOI: 10.1080/02757540.2018.1540613.
- [14] GARCÍA, Andrés Calderín, Luiz Gilberto Ambrosio DE SOUZA, Marcos Gervasio PEREIRA et al. Structure-Property-Function Relationship in Humic Substances to Explain the Biological Activity in Plants. *Scientific reports*. 2016, **6**(1), 20798-20798. DOI: 10.1038/srep20798.
- [15] ZHAO, Ningbo, Xin WANG, Lei QIN, Zhengze GUO a Dehua LI. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc, 2015, **465**(3), 569-574. ISSN 0006-291X.
- [16] STEINBÜCHEL, A, E. J VANDAMME a S DE BAETS. *Biopolymers. Volume 5, Polysaccharides I: polysaccharides from prokaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 532 s. ISBN 3-527-30226-3.
- [17] CHEN, Li hui, Jian feng XUE, Zhi yong ZHENG, Muhammad SHUHAIDI, Hnin ei THU a Zahid HUSSAIN. Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 2018, **116**, 572-584. ISSN 0141-8130.
- [18] ALBANO, Gd, A BONANNO, L CAVALIERI et al. Effect of high, medium, and low molecular weight hyaluronan on inflammation and oxidative stress in an in vitro model of human nasal epithelial cells. *European Respiratory Journal*. EUROPEAN RESPIRATORY SOC JOURNALS LTD, 2016, **48**(60). ISSN 0903-1936.
- [19] VALACCHI, Giuseppe, Giorgio GRISCI, Claudia STICOZZI et al. Wound healing properties of hyaluronan derivatives bearing ferulate residues. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015, **3**(35), 7037-7045. ISSN 2050-750X.
- [20] VIOLA, Manuela, Davide VIGETTI, Evgenia KAROUSOU, Maria D'ANGELO, Ilaria CAON, Paola MORETTO, Giancarlo LUCA a Alberto PASSI. Biology and

- biotechnology of hyaluronan. *Glycoconjugate Journal*. New York: Springer US, 2015, **32**(3), 93-103. ISSN 0282-0080.
- [21] HUANG, Gangliang a Junrong CHEN. Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 2019, **125**, 478-484. ISSN 0141-8130.
- [22] PRŮŠOVÁ, Alena, Frank j. VERGELDT a Jiří KUČERÍK. Influence of water content and drying on the physical structure of native hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2013, **95**(1), 515-521. ISSN 0144-8617.
- [23] SAPUDOM, Jiranuwat, Franziska ULLM, Steve MARTIN et al. Molecular weight specific impact of soluble and immobilized hyaluronan on CD44 expressing melanoma cells in 3D collagen matrices. *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd, 2017, **50**, 259-270. ISSN 1742-7061.
- [24] ALBÈR, Cathrine, Johan ENGBLOM, Peter FALKMAN a Vitaly KOCHERBITOV. Hydration of hyaluronan: effects on structural and thermodynamic properties. *The journal of physical chemistry. B*. 2015, **119**(11), 4211. DOI: 10.1021/jp511542e.
- [25] MONSLOW, James, Priya GOVINDARAJU a Ellen PURE. Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A, 2015, **6**(231). DOI: 10.3389/fimmu.2015.00231.
- [26] ŠAFRÁNKOVÁ, Barbora, Martina HERMANNOVÁ, Kristina NEŠPOROVÁ, Vladimír VELEBNÝ a Lukáš KUBALA. Absence of differences among low, middle, and high molecular weight hyaluronan in activating murine immune cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 2018, **107**, 1-8. ISSN 0141-8130.
- [27] SUO, Aili, Weijun XU, Yaping WANG, Tiantian SUN, Lijie JI a Junmin QIAN. Dual-degradable and injectable hyaluronic acid hydrogel mimicking extracellular matrix for 3D culture of breast cancer MCF-7 cells. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2019, **211**, 336-348. ISSN 0144-8617.
- [28] SINGH, Anirudha, Peter LI, Vince BEACHLEY, Peter MCDONNELL a Jennifer h. ELISSEFF. A hyaluronic acid-binding contact lens with enhanced water retention. *Contact Lens and Anterior Eye*. Elsevier Ltd, 2015, **38**(2), 79-84. ISSN 1367-0484.
- [29] BUKHARI, Syed nasir abbas, Nur liyana ROSWANDI, Muhammad WAQAS et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 2018, **120**, 1682-1695. ISSN 0141-8130.

- [30] SAHARIAH, Priyanka a Már MÁSSON. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2017, **18**(11), 3846-3868. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- [31] ISLAM, S., M. BHUIYAN a M. ISLAM. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*. New York: Springer US, 2017, **25**(3), 854-866. ISSN 1566-2543.
- [32] STEINBÜCHEL, A, E. J VANDAMME a S DE BAETS. *Biopolymers. Volume 6, Polysaccharides II: polysaccharides from eukaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 636 s. ISBN 3-527-30227-1.
- [33] CHUNYAN, Ma, Li FANG, Wang CAIHUA, He MIAO, Shen CHENSI, Sand WOLFGANG a Liu YANBIAO. Tuning the adsorption behaviour of beta-structure chitosan by metal binding. *Environmental Chemistry*. 2018, **15**(5), 267-277. DOI: <https://doi.org/10.1071/EN18070>.
- [34] TANABTABZADEH, Mohammad, Vahid JAVANBAKHT a Amir GOLSHIRAZI. Extraction of Betacyanin and Betaxanthin Pigments from Red Beetroots by Chitosan Extracted from Shrimp Wastes. *Waste and Biomass Valorization*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2019, **10**(3), 641-653. ISSN 1877-2641.
- [35] MAZEAU, Karim a Marguerite RINAUDO. Comparative properties of hyaluronan and chitosan in aqueous environment. *Polymer Science Series C*. Dordrecht: SP MAIK Nauka/Interperiodica, 2012, **54**(1), 96-107. ISSN 1811-2382.
- [36] MADELEINE-PERDRILLAT, C., T. KARBOWIAK, J. RAYA, R. GOUGEON, P.r. BODART a F. DEBEAUFORT. Water-induced local ordering of chitosan polymer chains in thin layer films. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2015, **118**, 107-114. ISSN 01448617.
- [37] GEGEL, Natalia, Tatyana BABICHEVA a Anna SHIPOVSKAYA. Morphology of Chitosan-Based Hollow Cylindrical Materials with a Layered Structure. *BioNanoScience*. New York: Springer US, 2018, **8**(2), 661-667. ISSN 2191-1630.
- [38] FU, J., F. YANG a Z. GUO. The chitosan hydrogels: from structure to function. *New Journal of Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 2018, **42**(21), 17162-17180. ISSN 11440546.
- [39] SOLOMON, Moses M, Saviour A UMOREN, Ime B OBOT, Ahmad A SOROUR a Husnu GERENGLI. Exploration of Dextran for Application as Corrosion Inhibitor for Steel in Strong Acid Environment: Effect of Molecular Weight, Modification, and Temperature

- on Efficiency. *ACS applied materials & interfaces*. 2018, **10**(33), 28112-28129. ISSN 1944-8252.
- [40] MAINA, Ndegwa H., Rwivoo BARUAH, Riikka JUVONEN, Riikka GOYAL a Ndegwa H. MAINA. Functional food applications of dextran from *Weissella cibaria* RBA12 from pummelo (*Citrus maxima*). *International Journal of Food Microbiology*. 2017, (127), 124-131. ISSN 01681605.
- [41] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Application of dextran as nanoscale drug carriers. *NANOMEDICINE*. 2018, **13**(24), 3149-3158. ISSN 1743-5889.
- [42] BACHELDER, Bachelder, Eric M, Erica N PINO a Kristy M AINSLIE. Acetalated Dextran: A Tunable and Acid-Labile Biopolymer with Facile Synthesis and a Range of Applications. *Chemical reviews*. 2017, **117**(3), 1915-1926. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00532.
- [43] PAN, Jian-feng, Liu YUAN, Chang-an GUO et al. Fabrication of modified dextrangelatin in situ forming hydrogel and application in cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, **2**(47), 8346-8360. DOI: 10.1039/c4tb01221f. ISSN 2050-750X.
- [44] TANG, Xiaojuan, Binle ZHANG, Weining HUANG, Zilin MA, Fengwen ZHANG, Feng WANG, Qibo ZOU a Jianxian ZHENG. Hydration, water distribution and microstructure of gluten during freeze thaw process: Role of a high molecular weight dextran produced by *Weissella confusa* QS813. *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 2019, **90**, 377-384. ISSN 0268-005X.
- [45] CIHLÁŘ, Z., L. VOJTOVÁ, L. MICHLOVSKÁ a J. KUČERÍK. Preparation and hydration characteristics of carbodiimide crosslinked lignite humic acids. *Geoderma*. Elsevier B.V, 2016, **274**, 10-17. ISSN 00167061.
- [46] ALVARADO, Sofia, Glória SANDOVAL, Isidro PALOS, Simón TELLEZ, Yaneli AGUIRRE-LOREDO a Gonzalo VELAZQUEZ. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. *Food Science and Technology*. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015, **35**(4), 690-695. ISSN 1678-457X.
- [47] FEI, Ben a Qing SHEN. Effects of molecule weight on the liquid adsorption, surface free energy and rheological properties of dextran. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. Taylor & Francis, 2018, **55**(8), 611-617. ISSN 1060-1325.

- [48] FAUCARD, Pauline, Florent GRIMAUD, Denis LOURDIN et al. Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2018, **181**, 337-344. ISSN 0144-8617.
- [49] TIMMERMAN, Inga-Lis, Hartwig STECKEL a Michael TRUNK. Assessing the re-crystallization behaviour of amorphous lactose using the RH-perfusion cell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V, 2006, **64**(1), 107-114. ISSN 09396411.
- [50] ŠMÉRALOVÁ, Ester. *Hydratace biopolymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [51] RIGOBELLO, Eliane Sloboda, Sandro Xavier CAMPOS, Eduardo Ribeiro de AZEVEDO, Angela di Bernardo DANTAS a Eny Maria VIEIRA. Comparative characterization of humic substances extracted from freshwater and peat of different apparent molecular sizes. *Revista Ambiente & Água*. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrográficas, 2017, **12**(5), 774-785. DOI: 10.4136/ambi-agua.2022. ISSN 1980-993X.
- [52] MLČOCH, Tomáš a Jiří KUČERÍK. Hydration and drying of various polysaccharides studied using DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, **113**(3), 1177-1185. ISSN 13886150.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATR-IR – infračervená spektroskopie zeslabené úplné reflektance

Da – Dalton

DCC – N,N'-dicyklohexylkarbodiimid

DMA – dynamická mechanická analýza

DOC – rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon)

DSC – diferenční kompenzační kalorimetrie

EDC – N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

FK – fulvinové kyseliny

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

HA – hyaluronová kyselina

HK – huminové kyseliny

HL – huminové látky

^1H NMR – protonová nukleární magnetická rezonance

HYAL – hyaluronan

IHSS – společnost International Humic Substances Society

L. M. – *Leuconostoc mesenteroides*

PP – Pahokee Peat

RH – relativní vlhkost

SR – Suwannee River

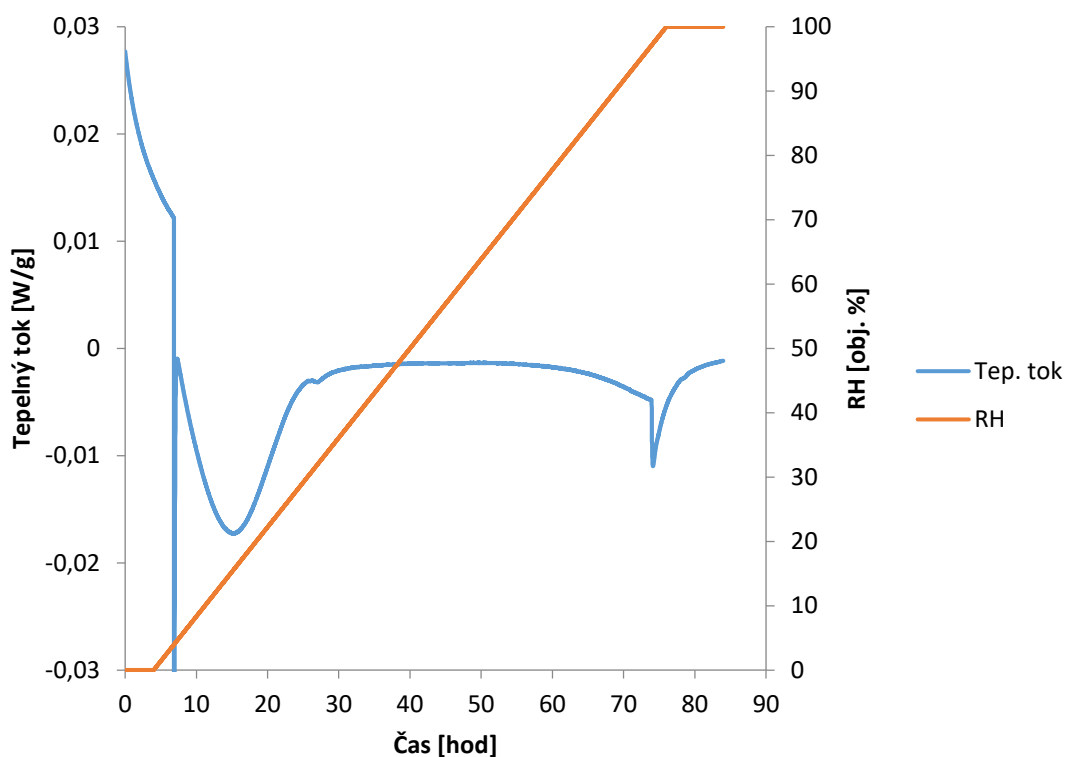
TGA – termogravimetrická analýza

T_g – teplota skelného přechodu

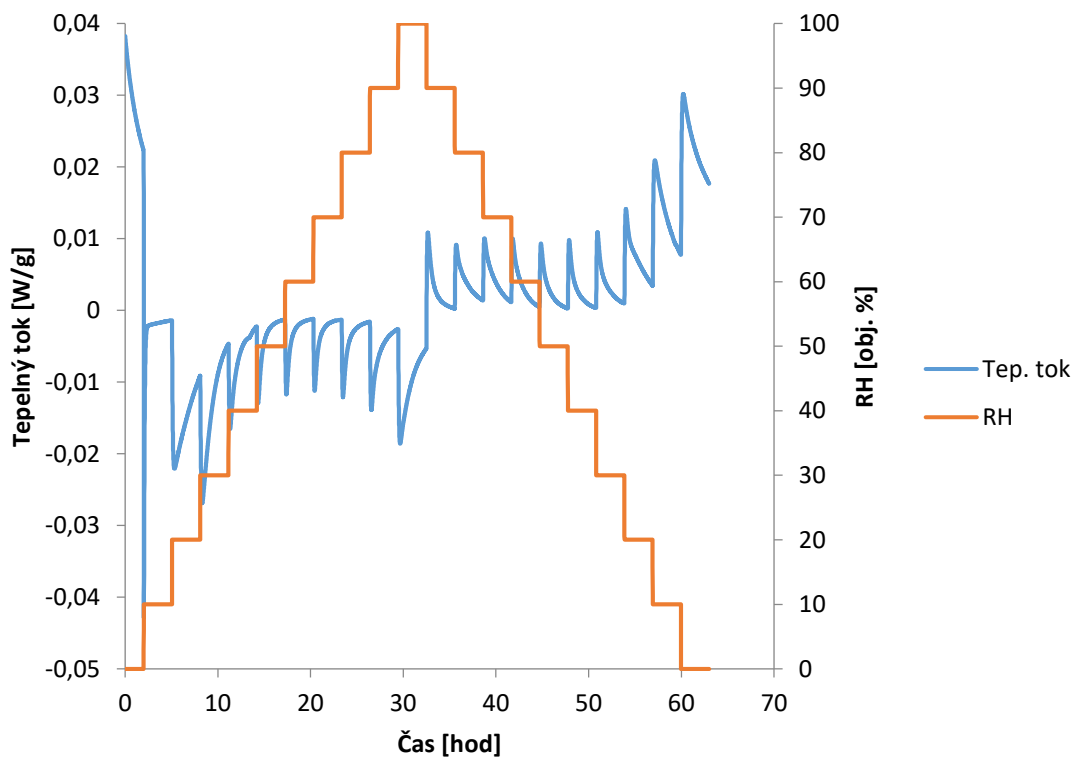
TOC – celkový organický uhlík (total organic carbon)

X-ray diffraction – rentgenová difrakce

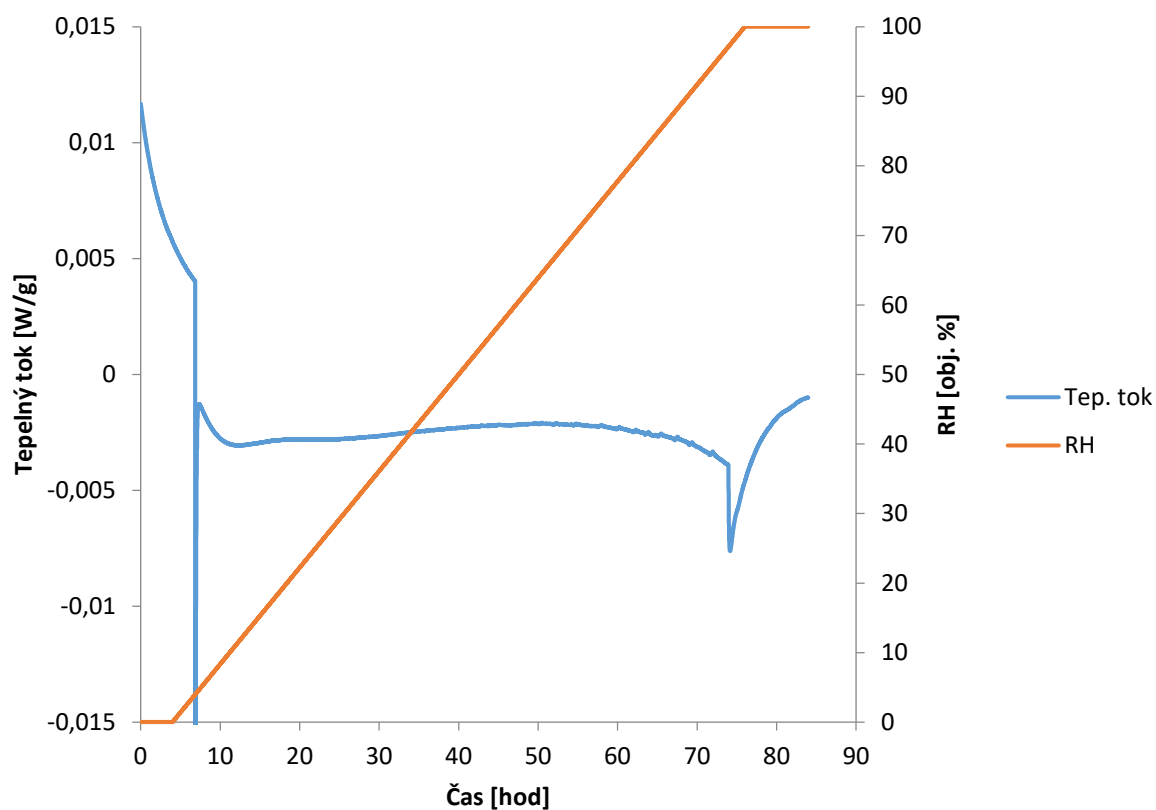
8 PŘÍLOHY



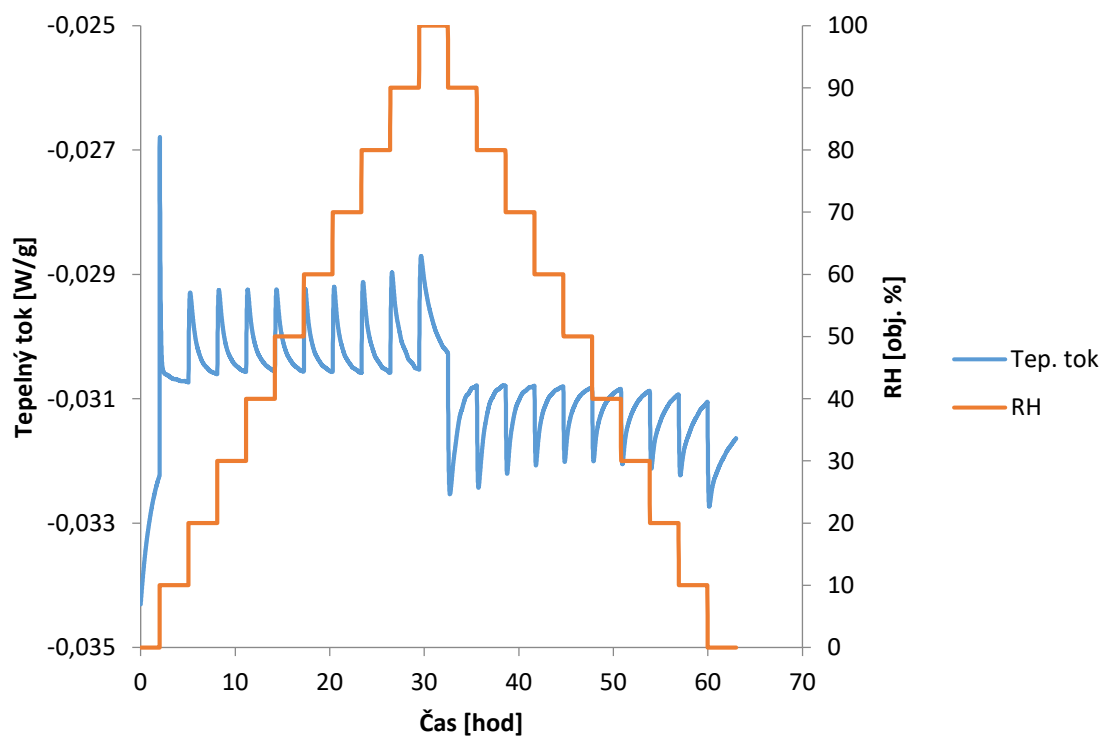
Příloha 1: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok FK SR při kontinuálním přívodu RH



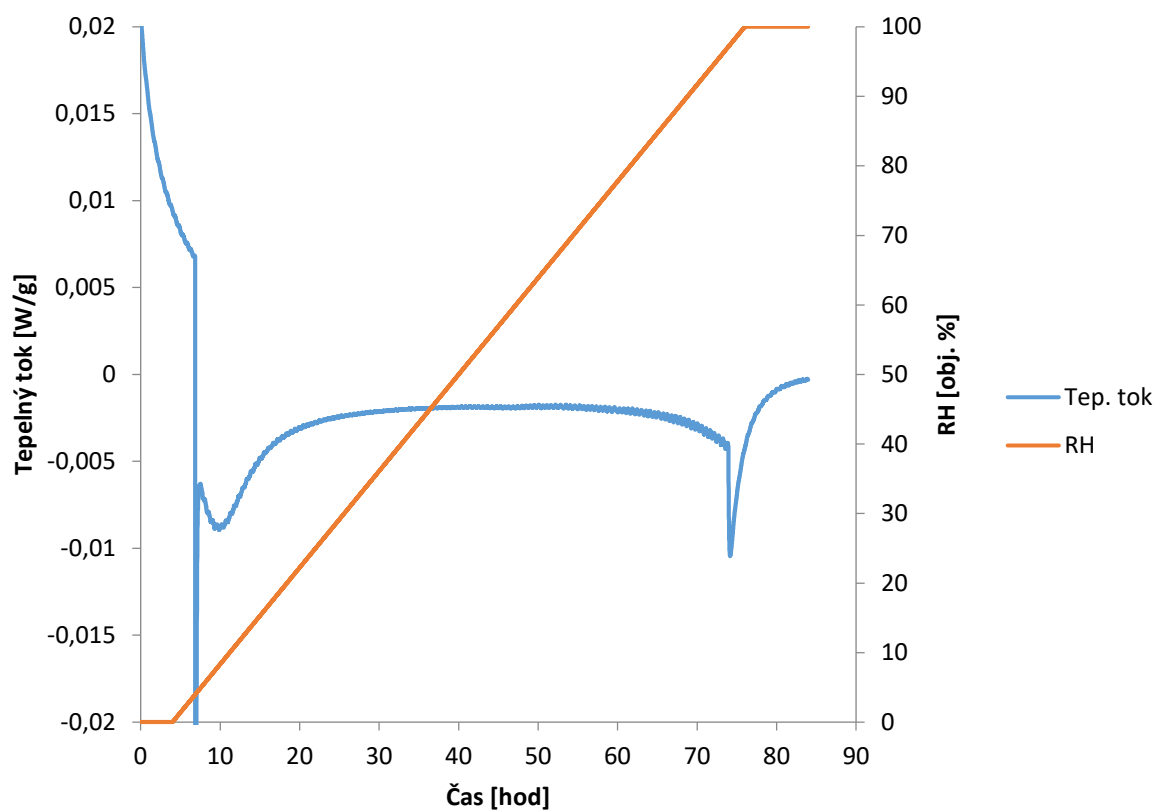
Příloha 2: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok FK SR při krokovém přívodu RH



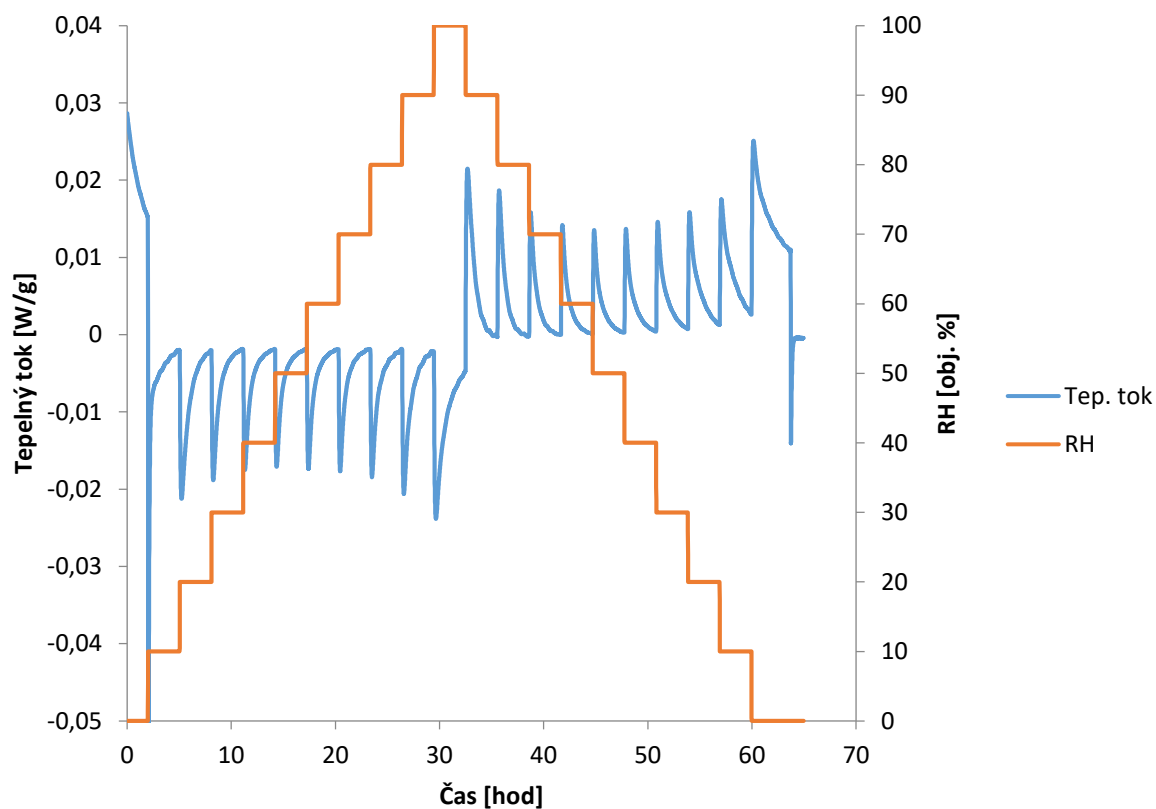
Příloha 3: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HK PP při kontinuálním přívodu RH



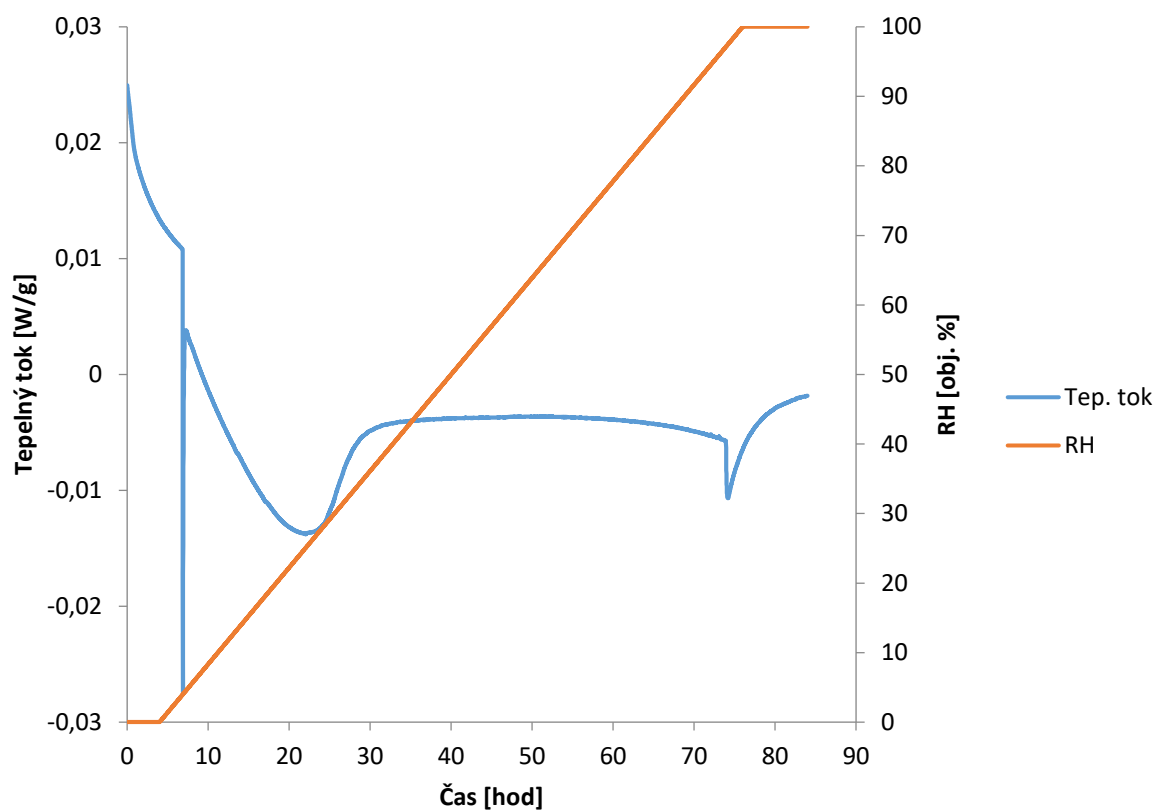
Příloha 4: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HK PP při krokovém přívodu RH



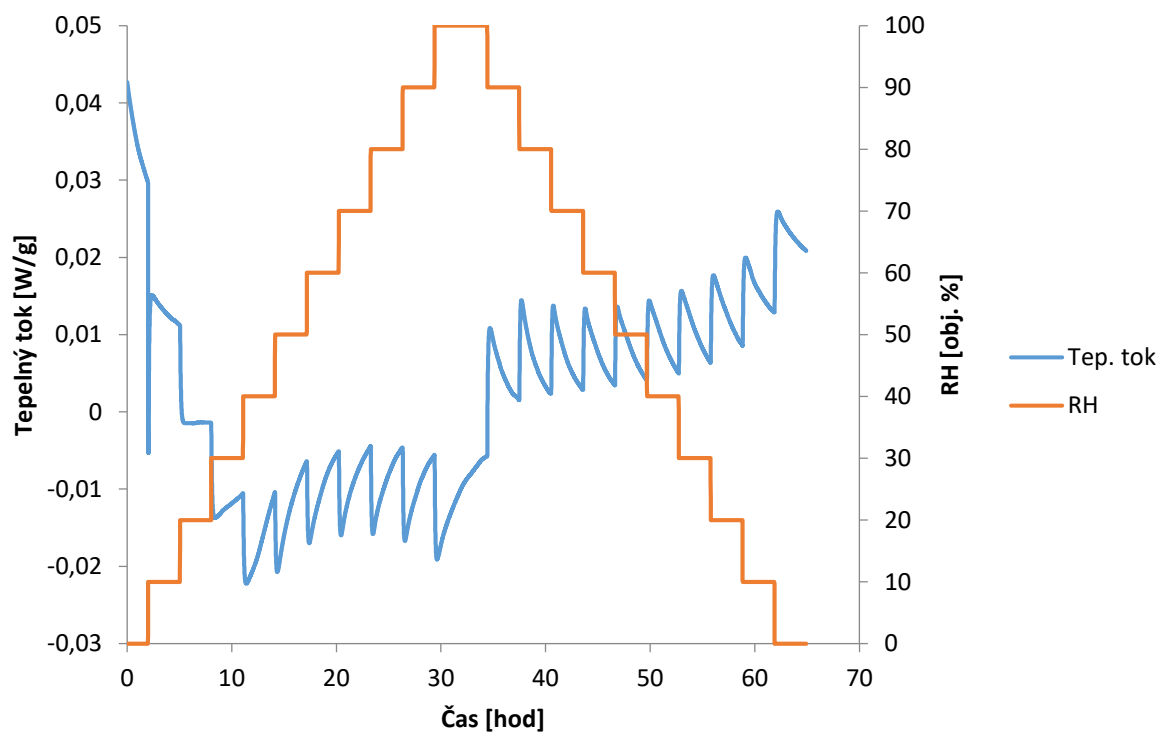
Příloha 5: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HK SR při kontinuálním přívodu RH



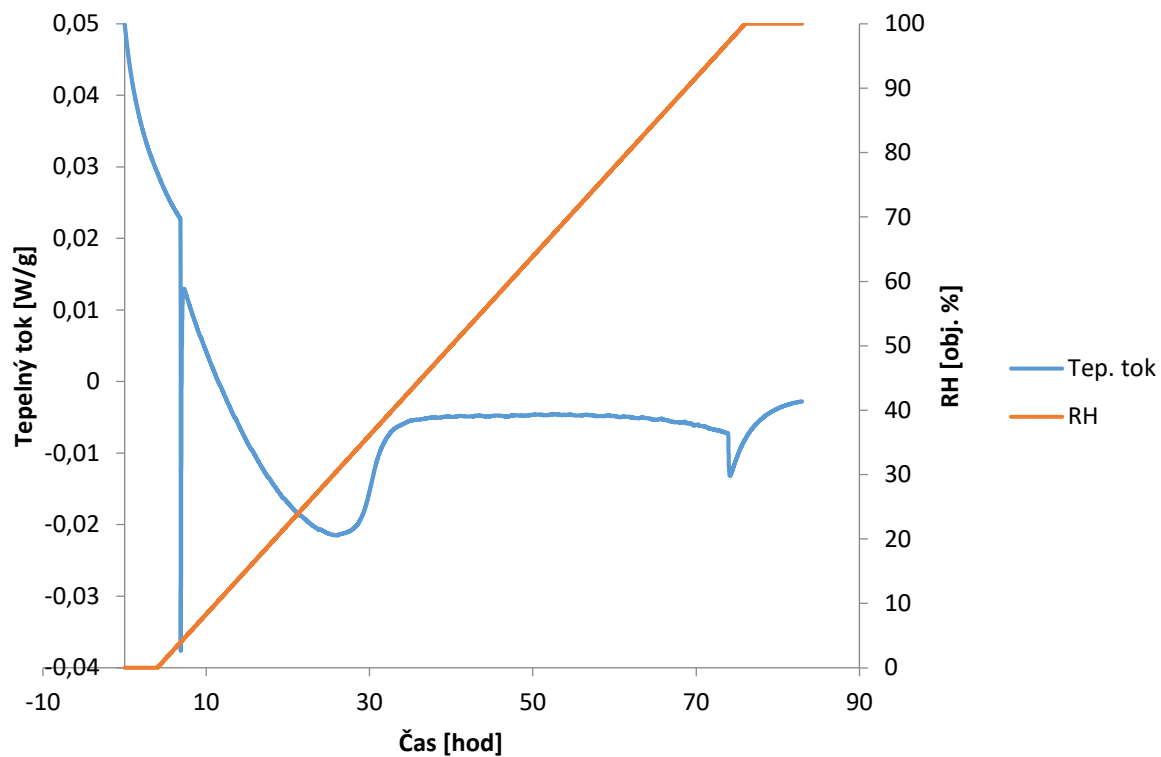
Příloha 6: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HK SR při krokovém přívodu RH



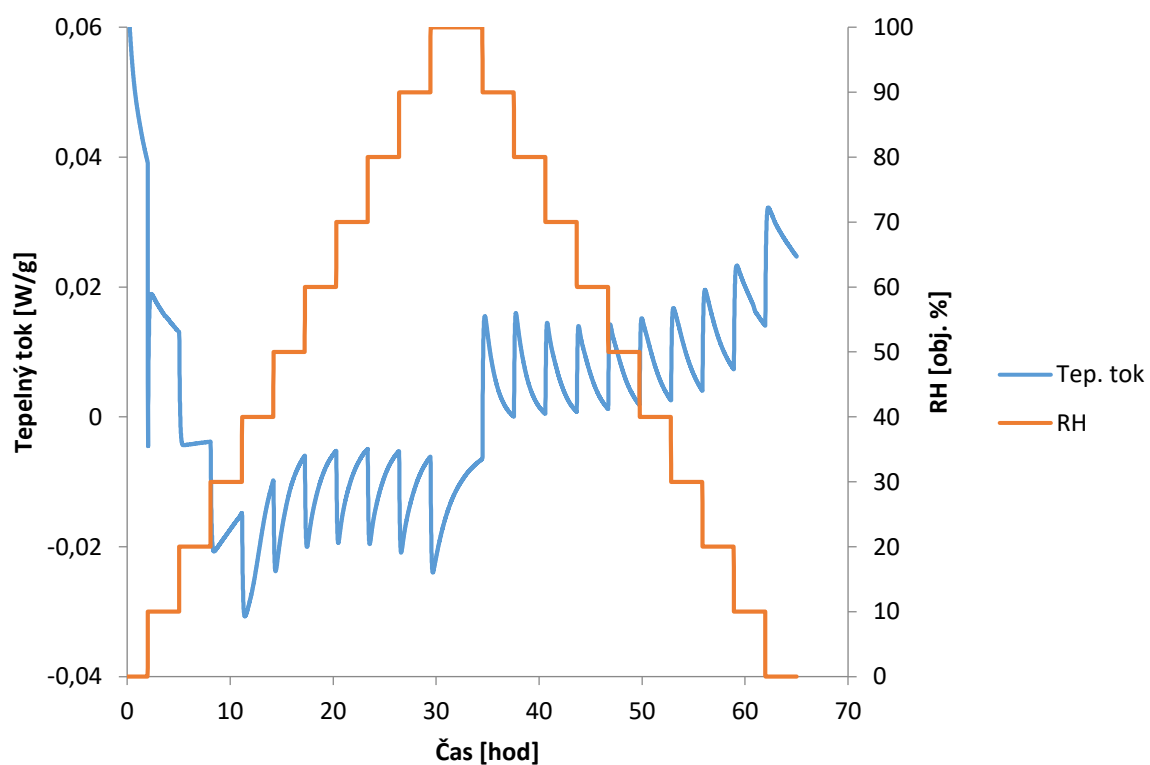
Příloha 7: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 130 – 300 při kontinuálním přívodu RH



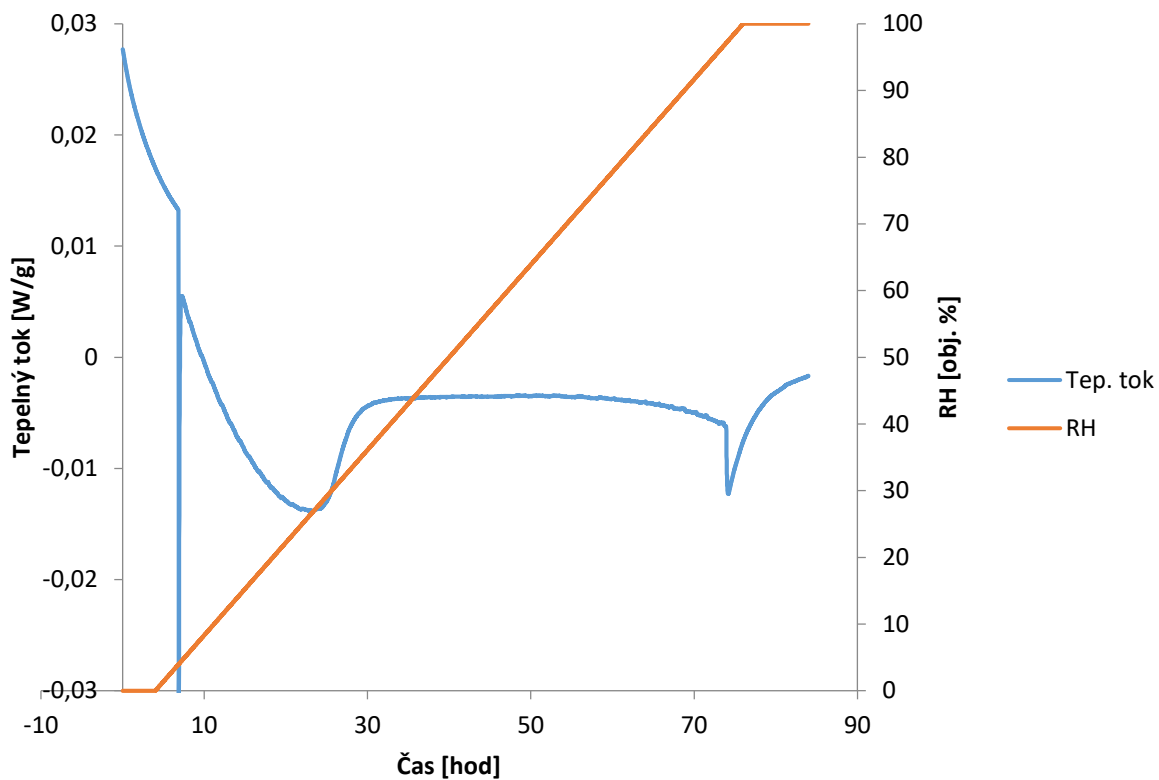
Příloha 8: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 130 – 300 při krokovém přívodu RH



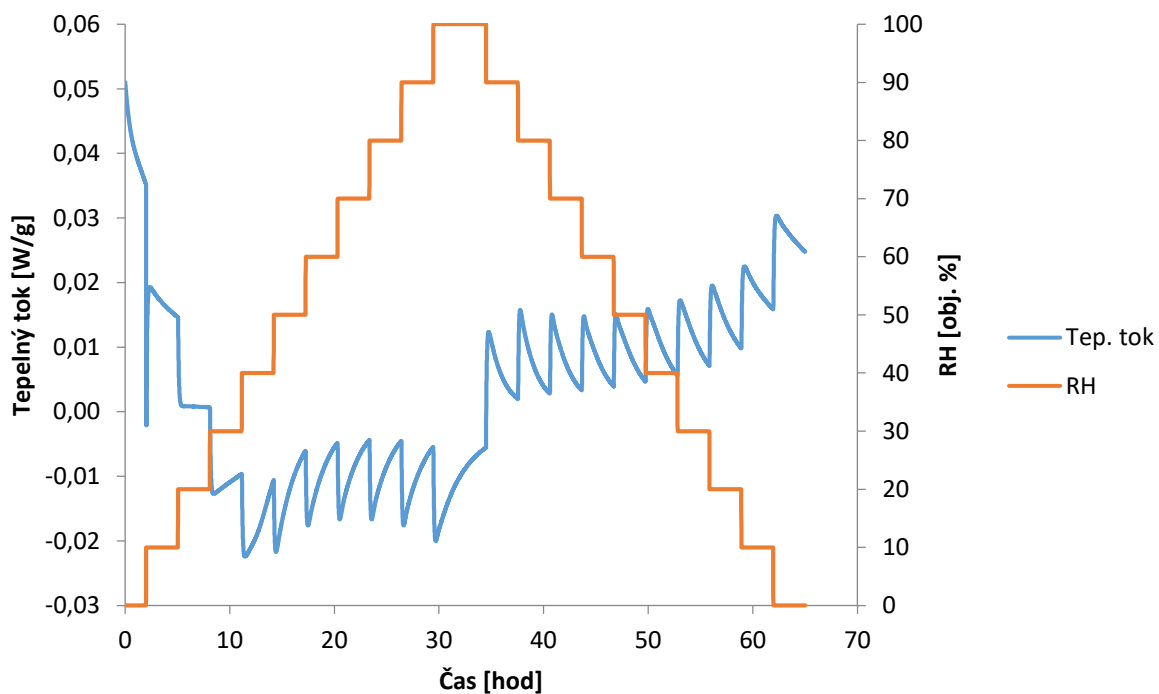
Příloha 9: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 500 – 750 při kontinuálním přívodu RH



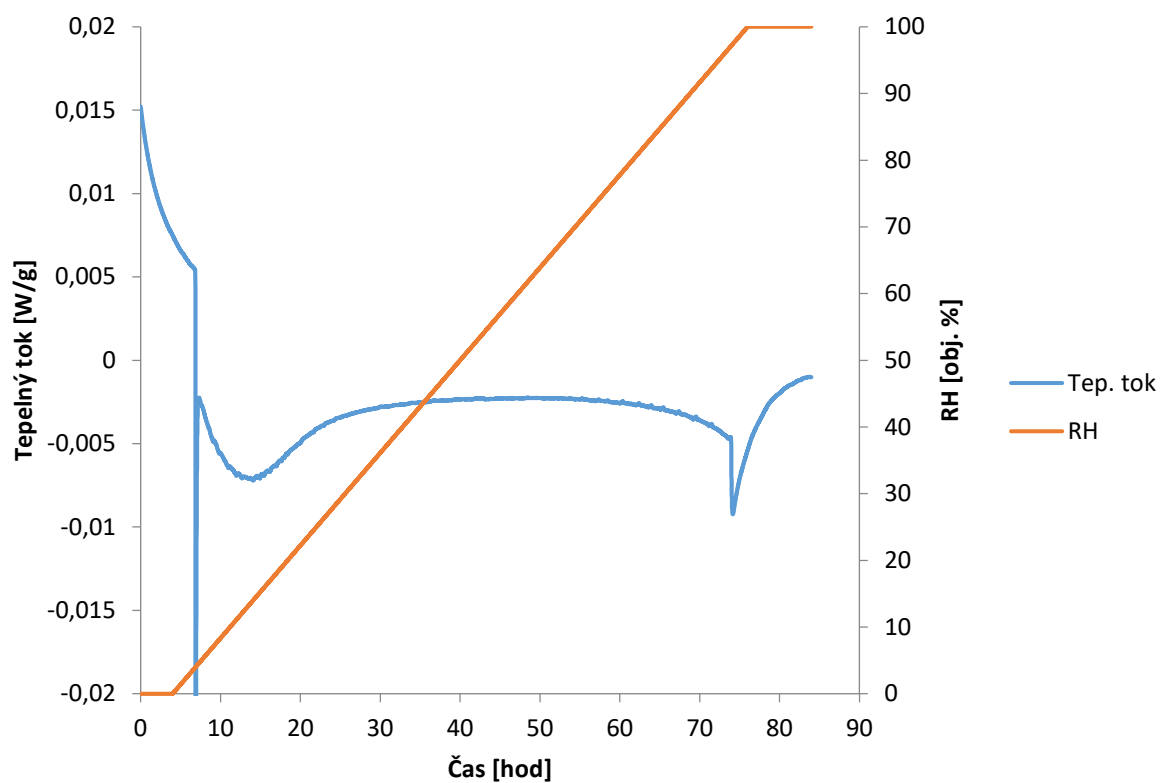
Příloha 10: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 500 – 750 při krokovém přívodu RH



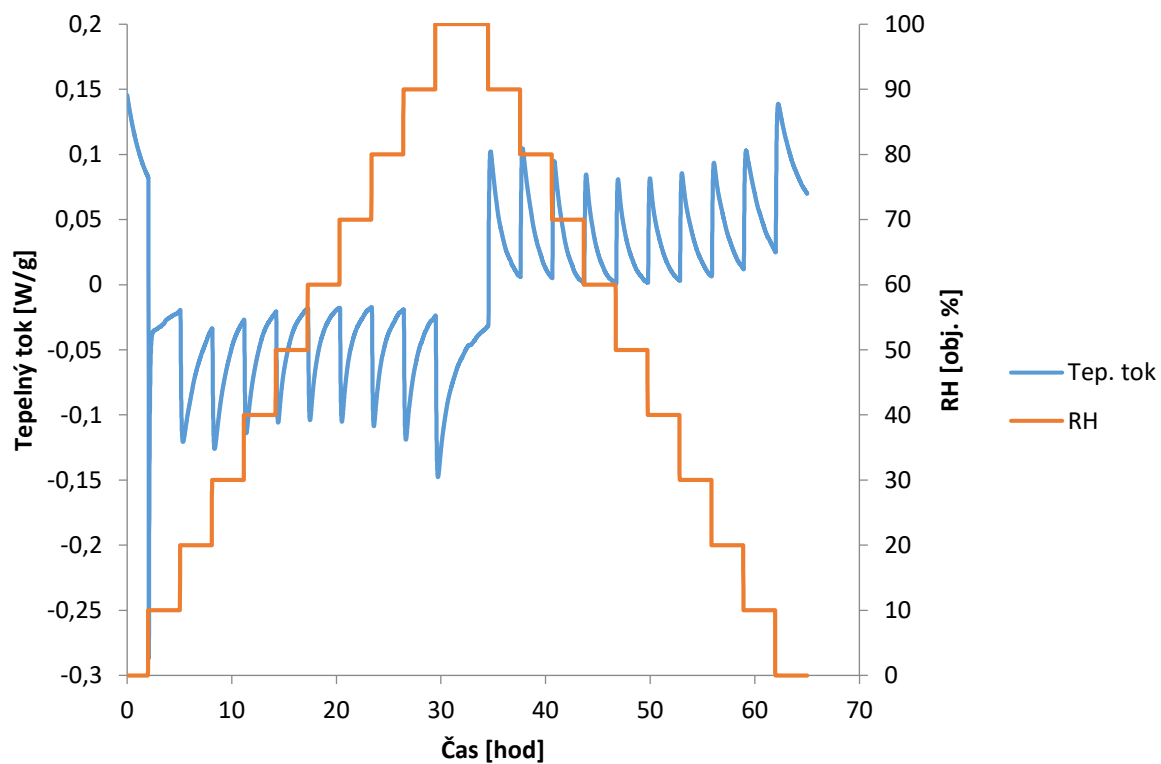
Příloha 11: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 1 500 – 1 750 při kontinuálním přívodu RH



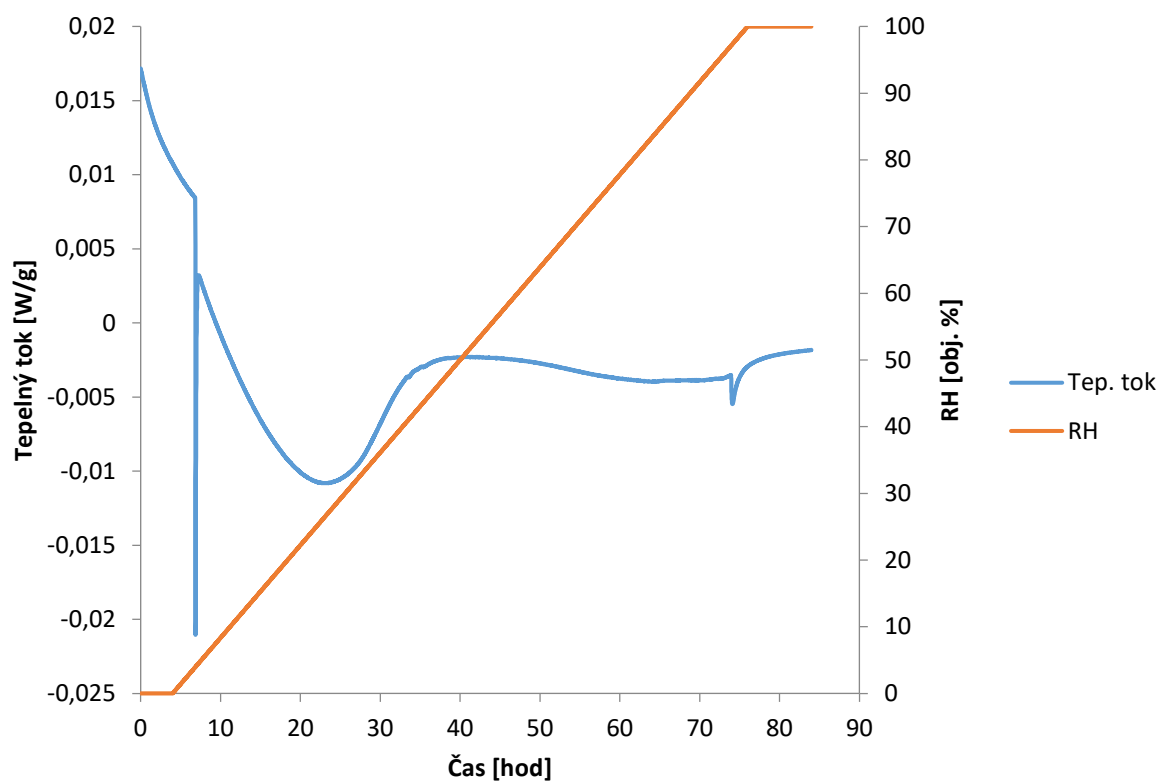
Příloha 12: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok HYAL 1 500 – 1 750 při krokovém přívodu RH



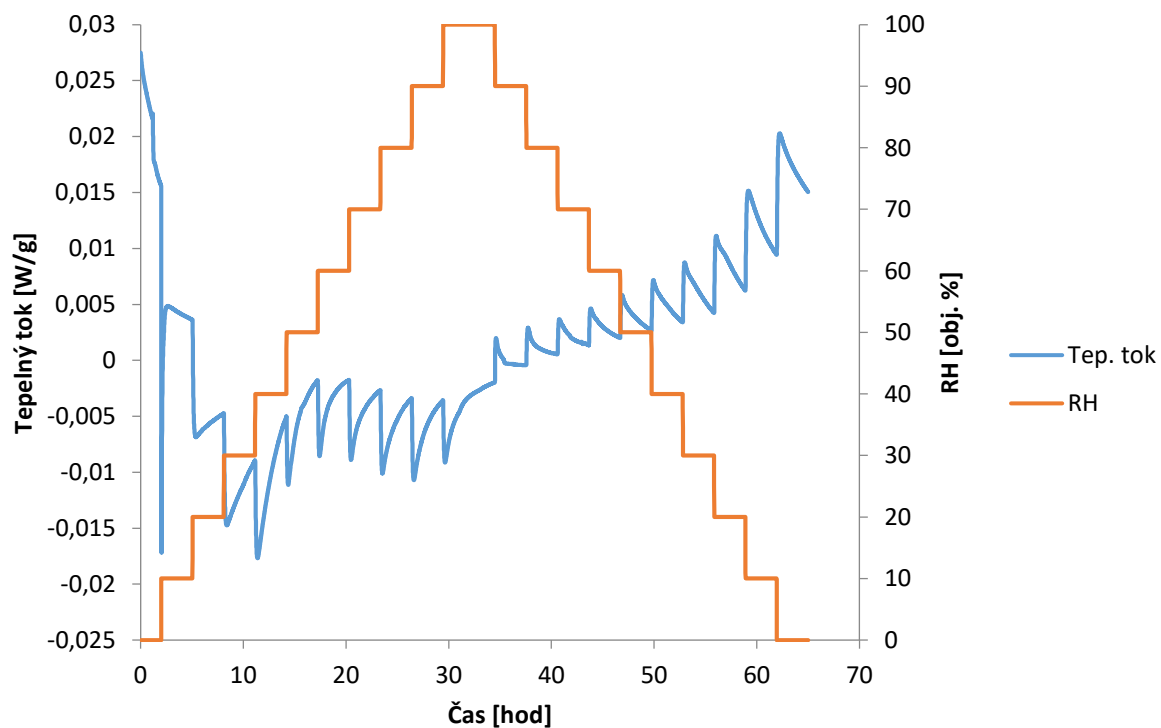
Příloha 13: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok chitosanu při kontinuálním přívodu RH



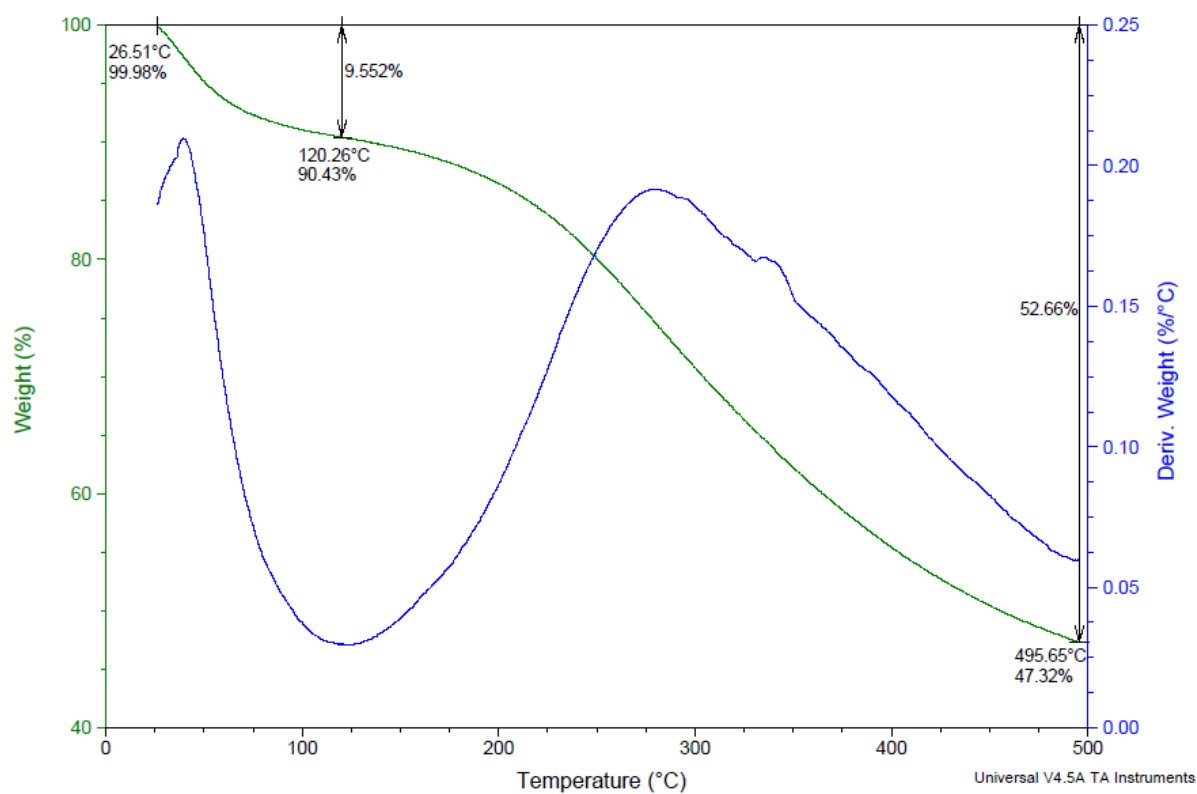
Příloha 14: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok chitosanu při krokovém přívodu RH



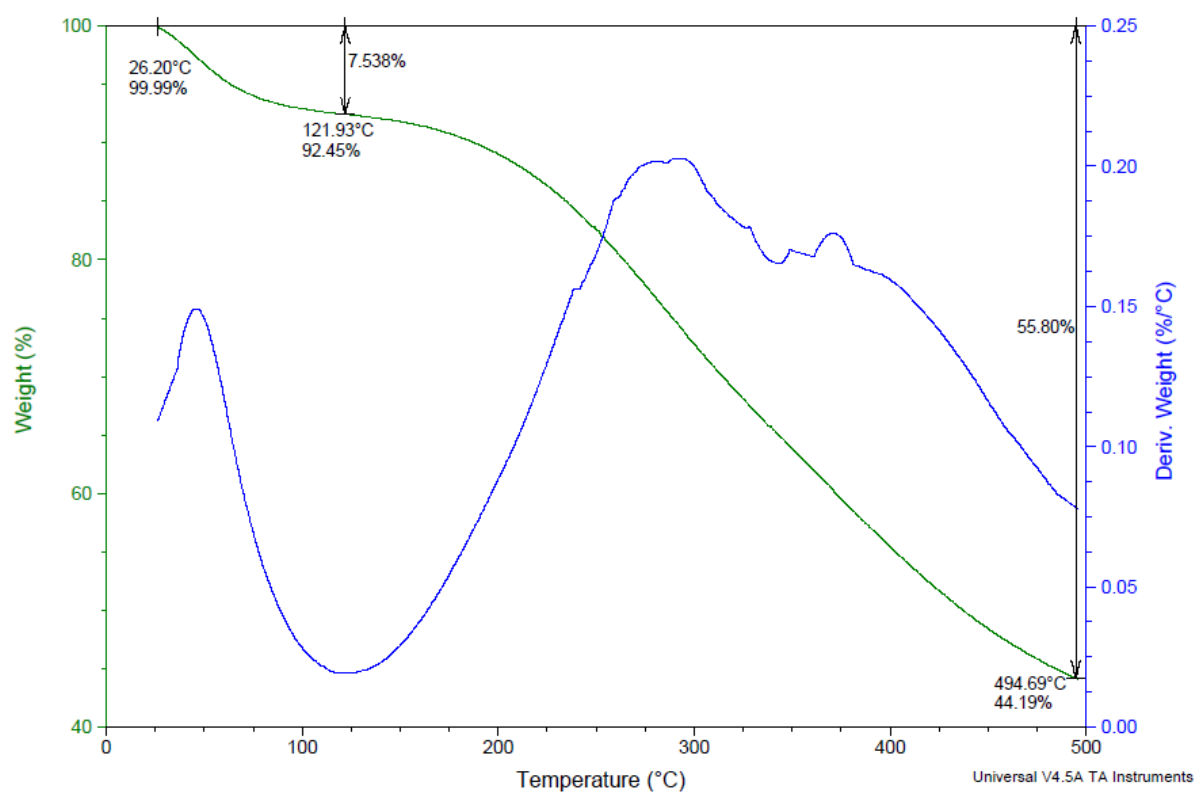
Příloha 15: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok dextranu při kontinuálním přívodu RH



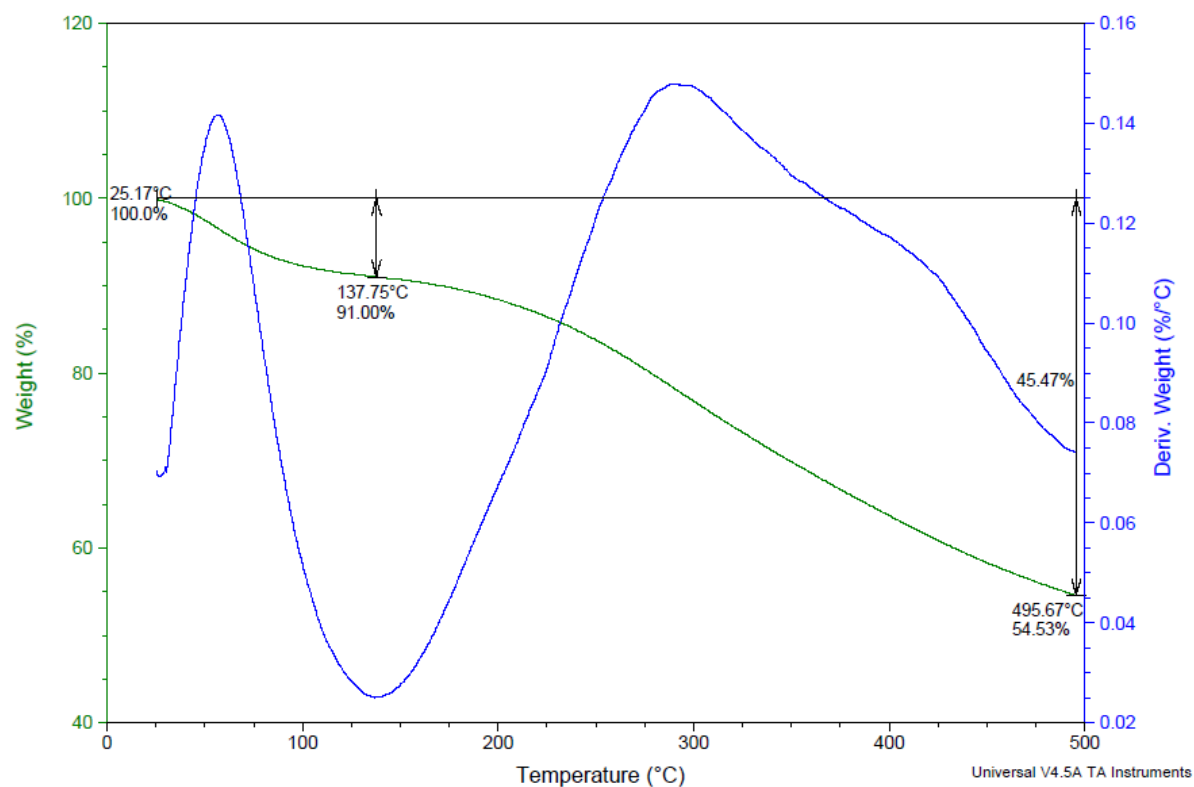
Příloha 16: Perfuzní kalorimetrie – tepelný tok dextranu při krokovém přívodu RH



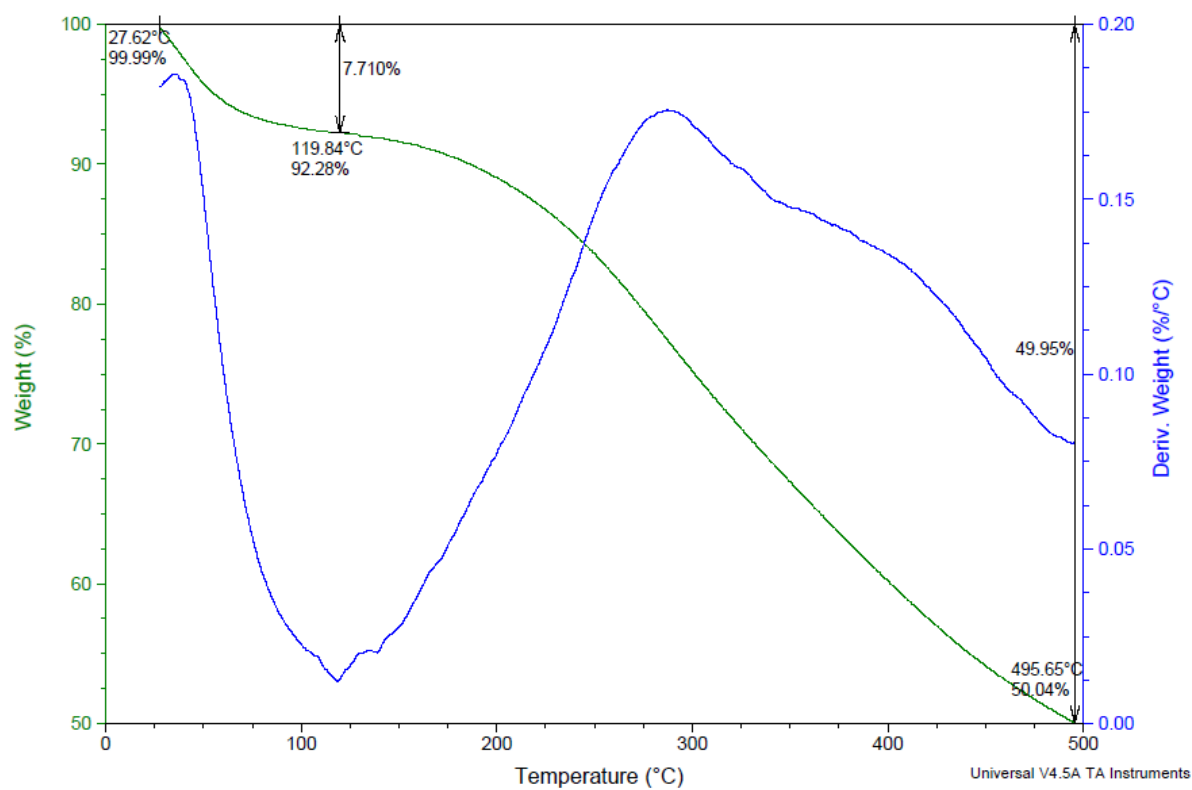
Příloha 17: Termogravimetrická analýza FK PP



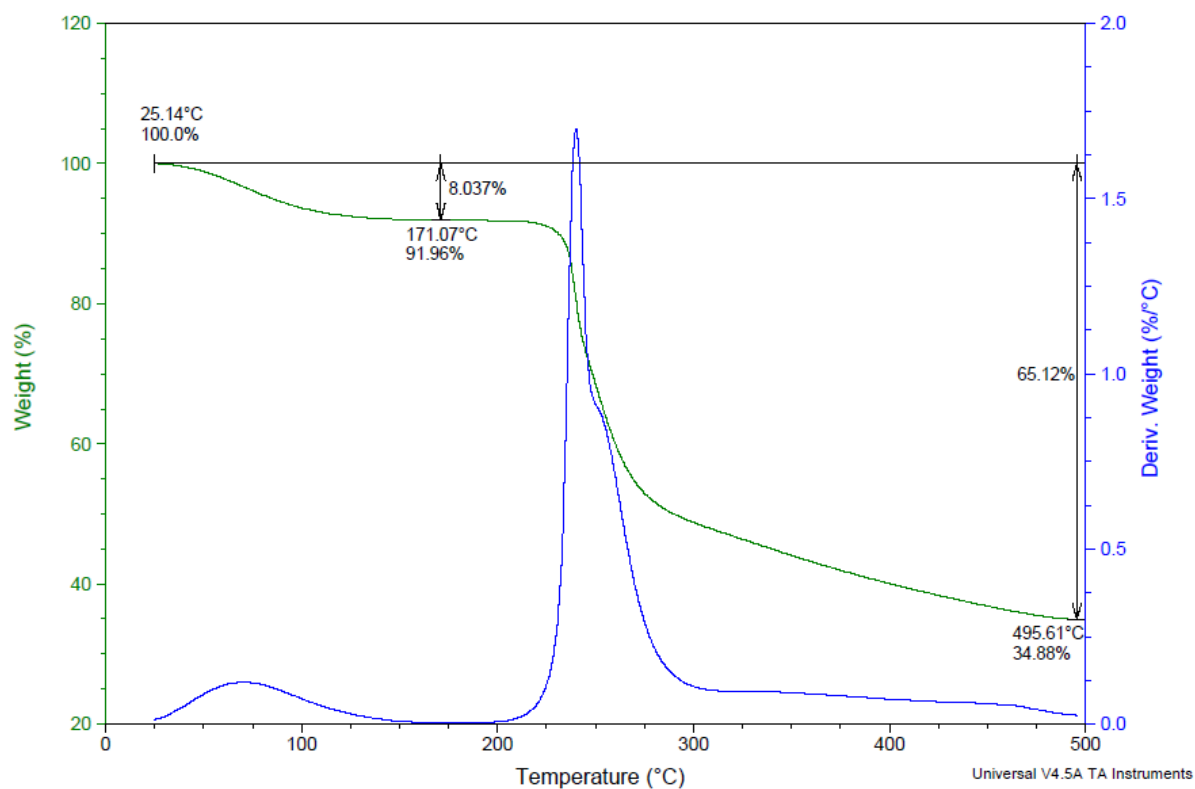
Příloha 18: Termogravimetrická analýza FK SR



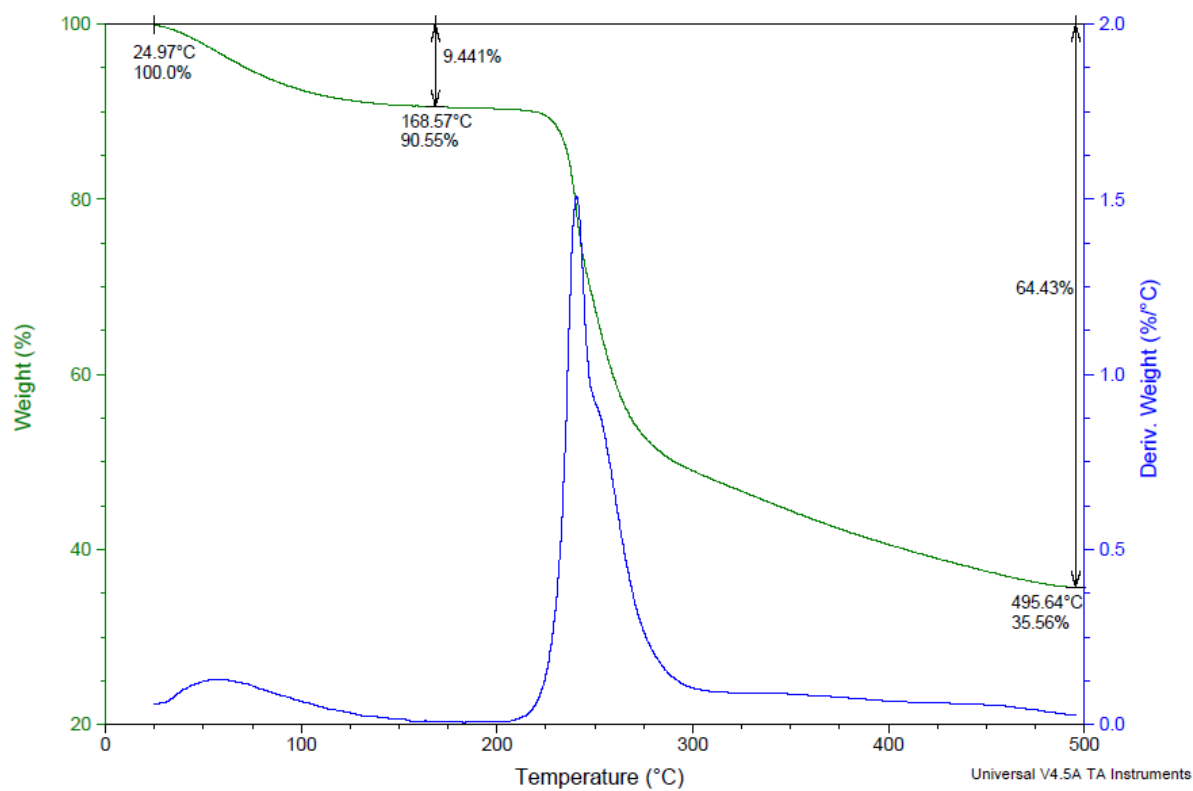
Příloha 19: Termogravimetrická analýza HK PP



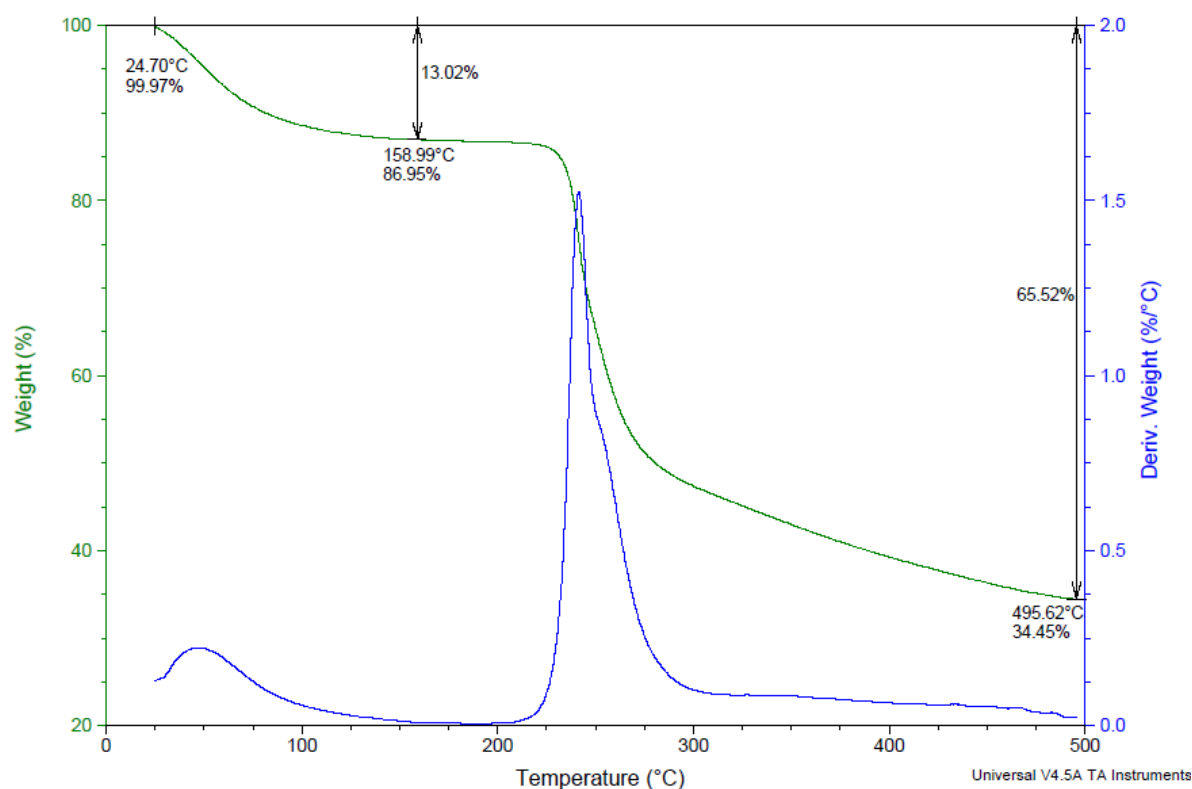
Příloha 20: Termogravimetrická analýza HK SR



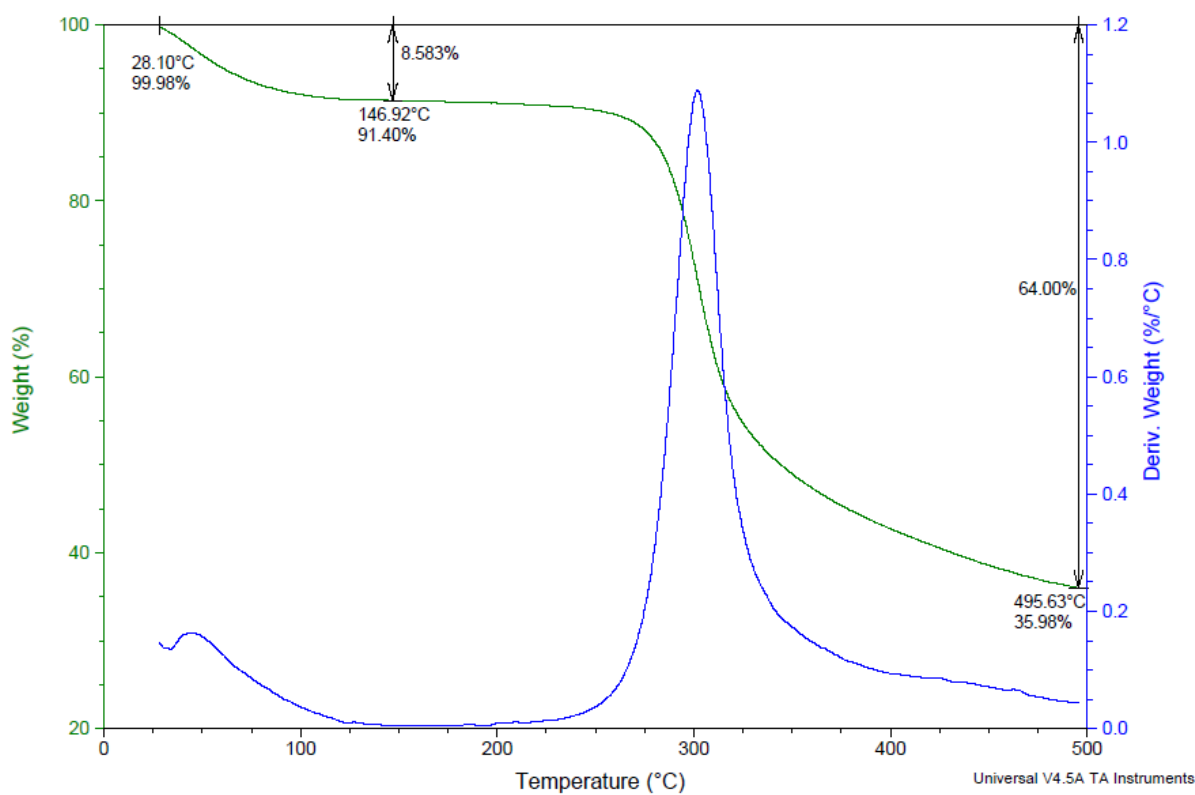
Příloha 21: Termogravimetrická analýza HYL 130 – 300



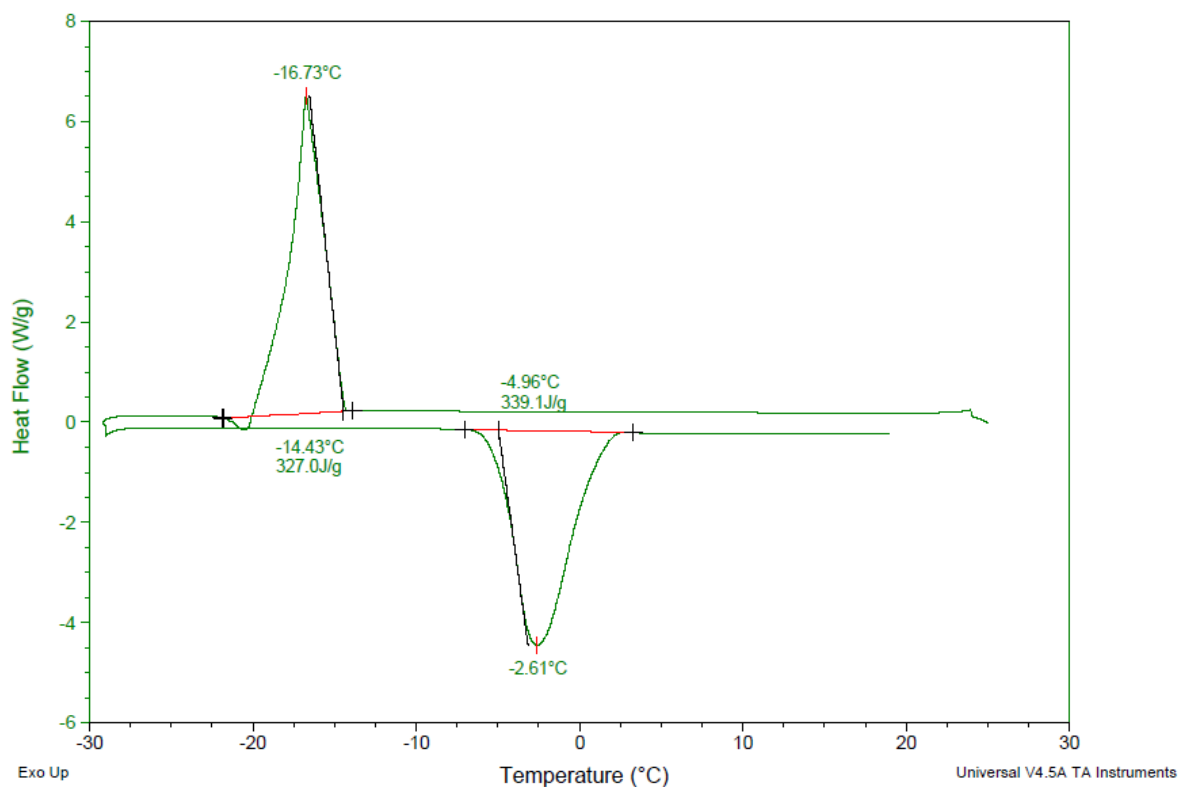
Příloha 22: Termogravimetrická analýza HYL 500 – 750



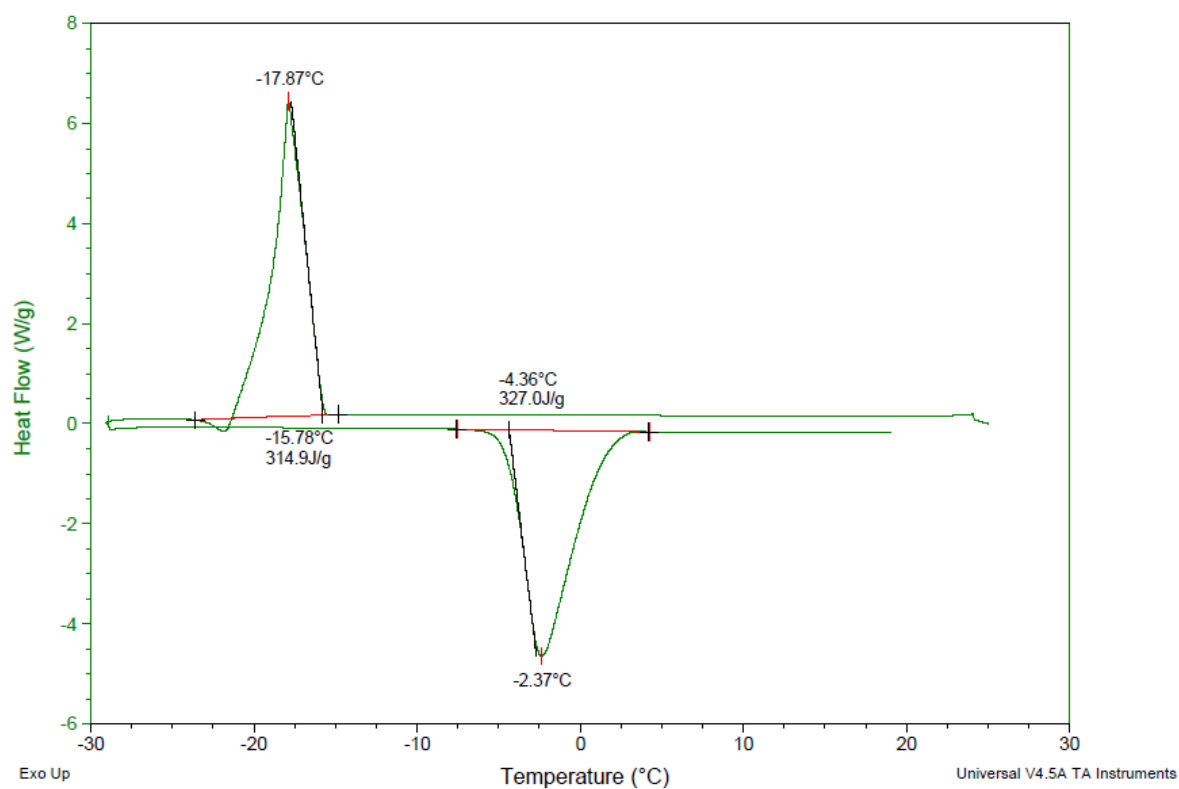
Příloha 23: Termogravimetrická analýza HYL 1 500 – 1 750



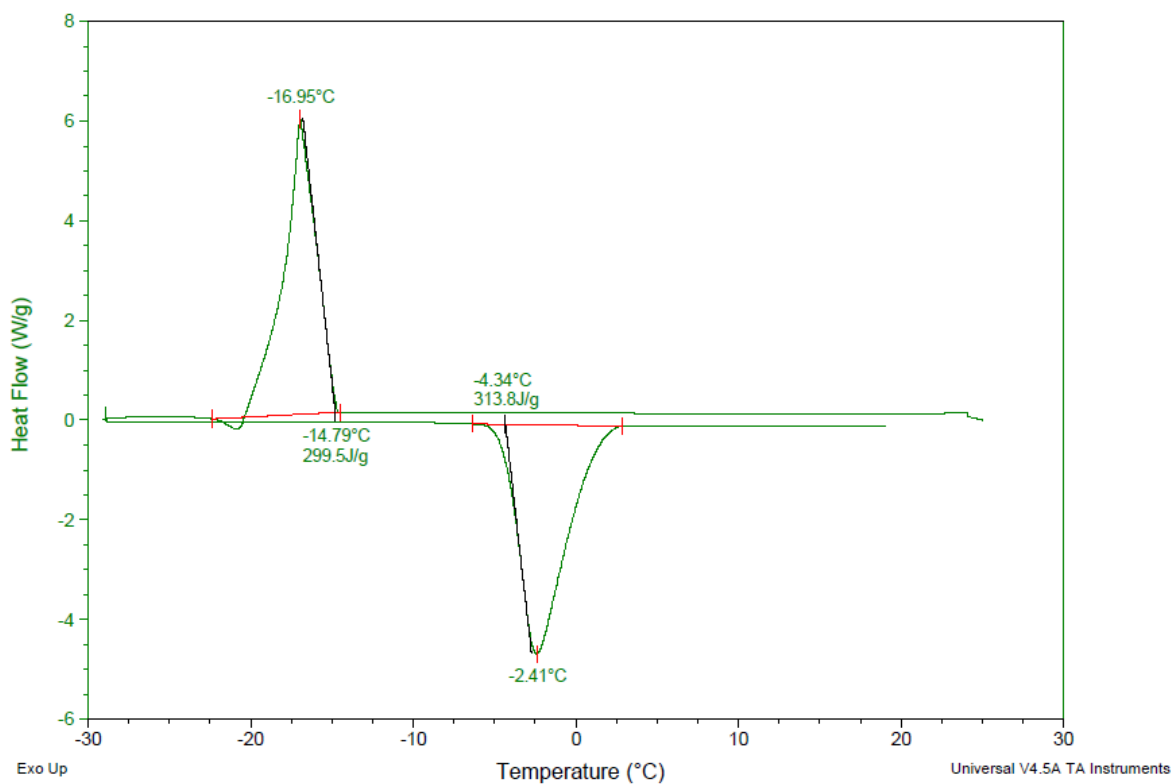
Příloha 24: Termogravimetrická analýza chitosanu



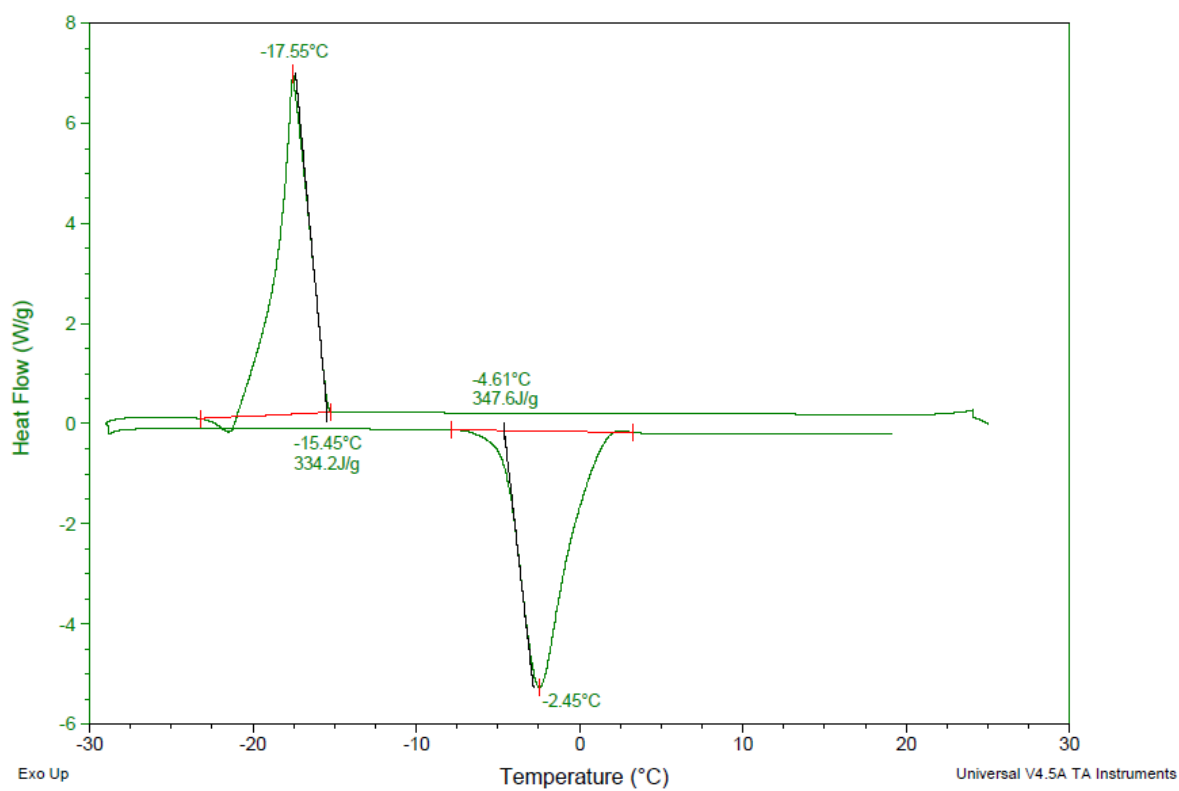
Příloha 25: DSC – FK PP ihned po smíchání s vodou



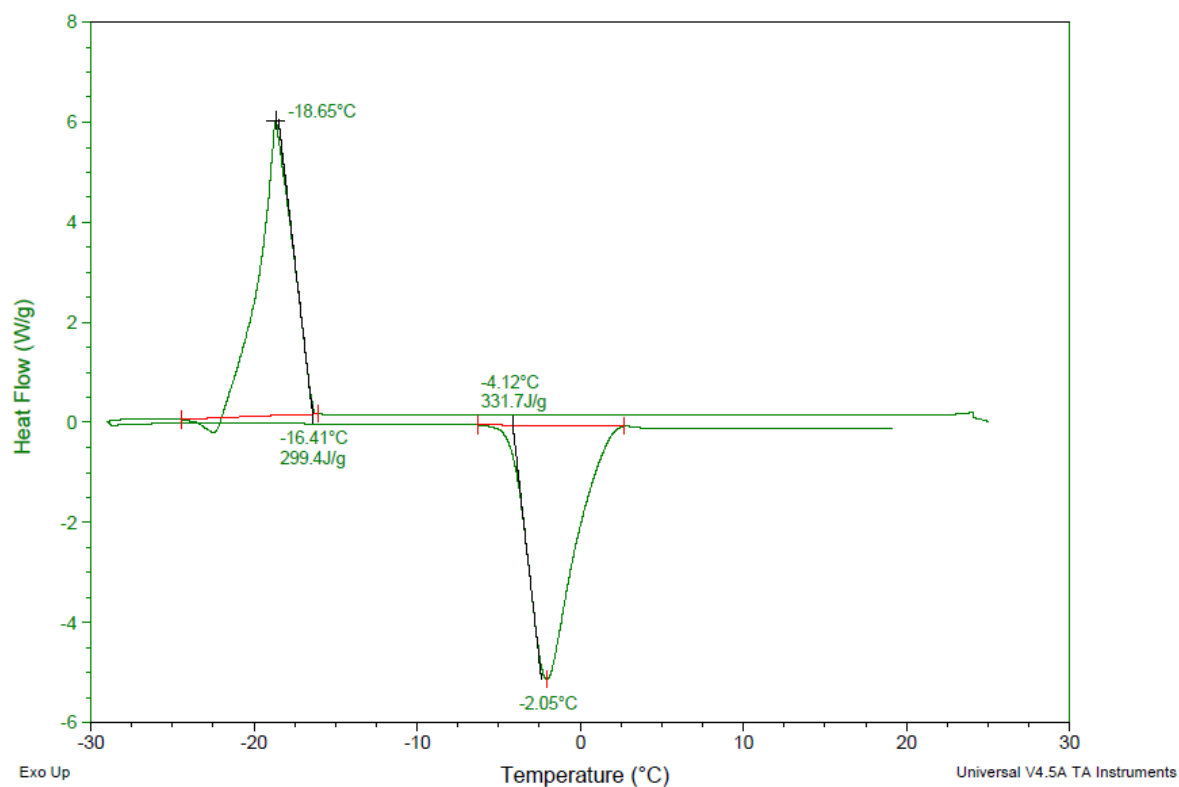
Příloha 26: DSC – FK PP po 24 hodinách



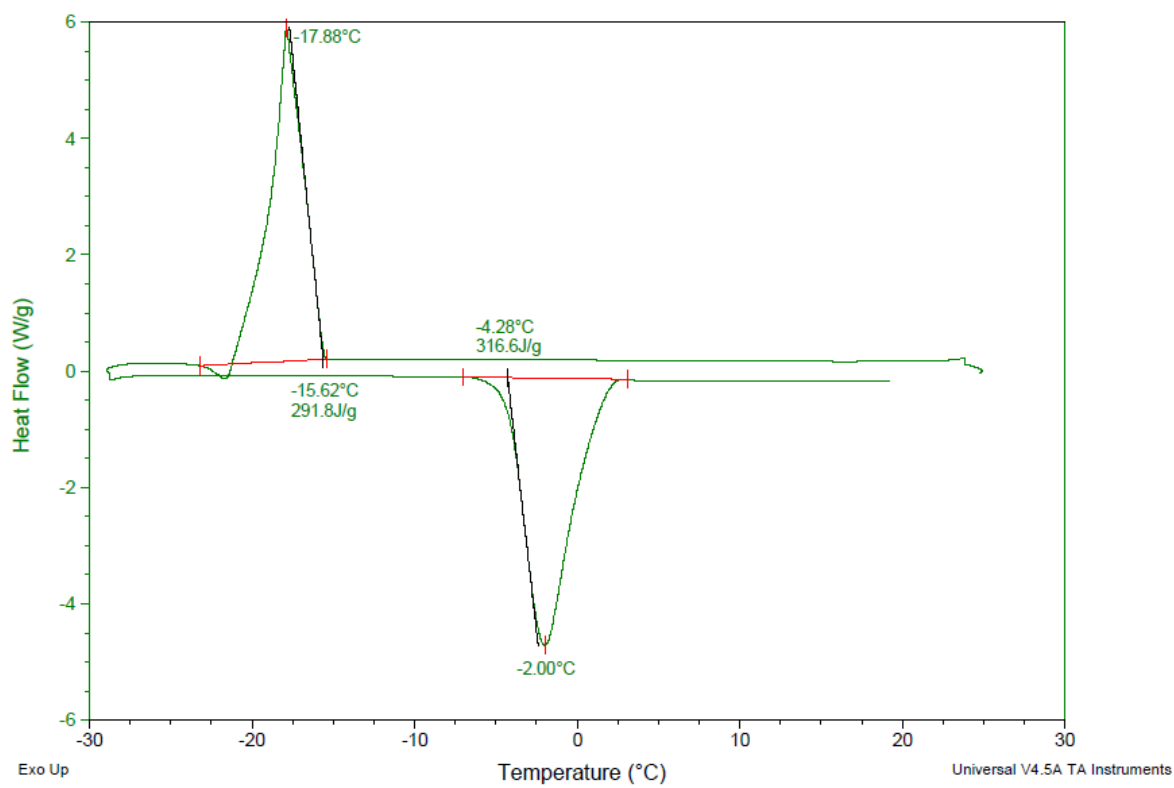
Příloha 27: DSC – FK SR ihned po smíchání s vodou



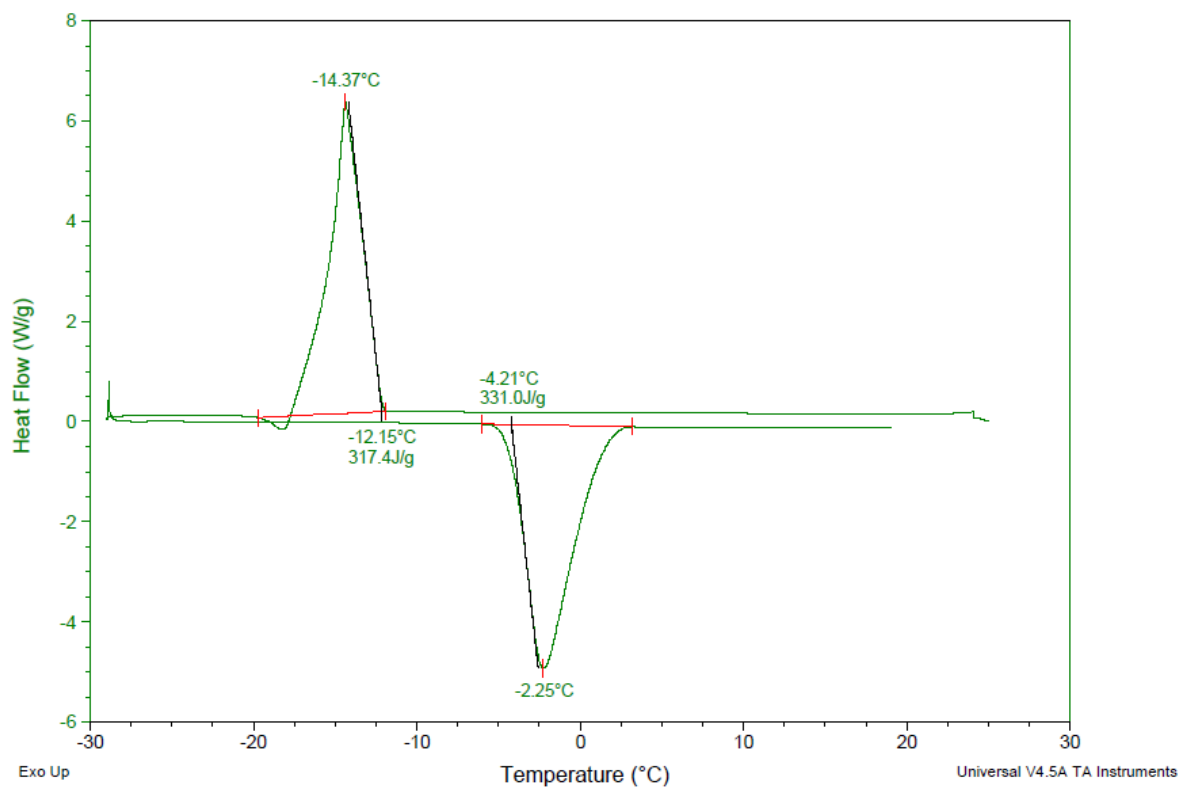
Příloha 28: DSC – FK SR po 24 hodinách



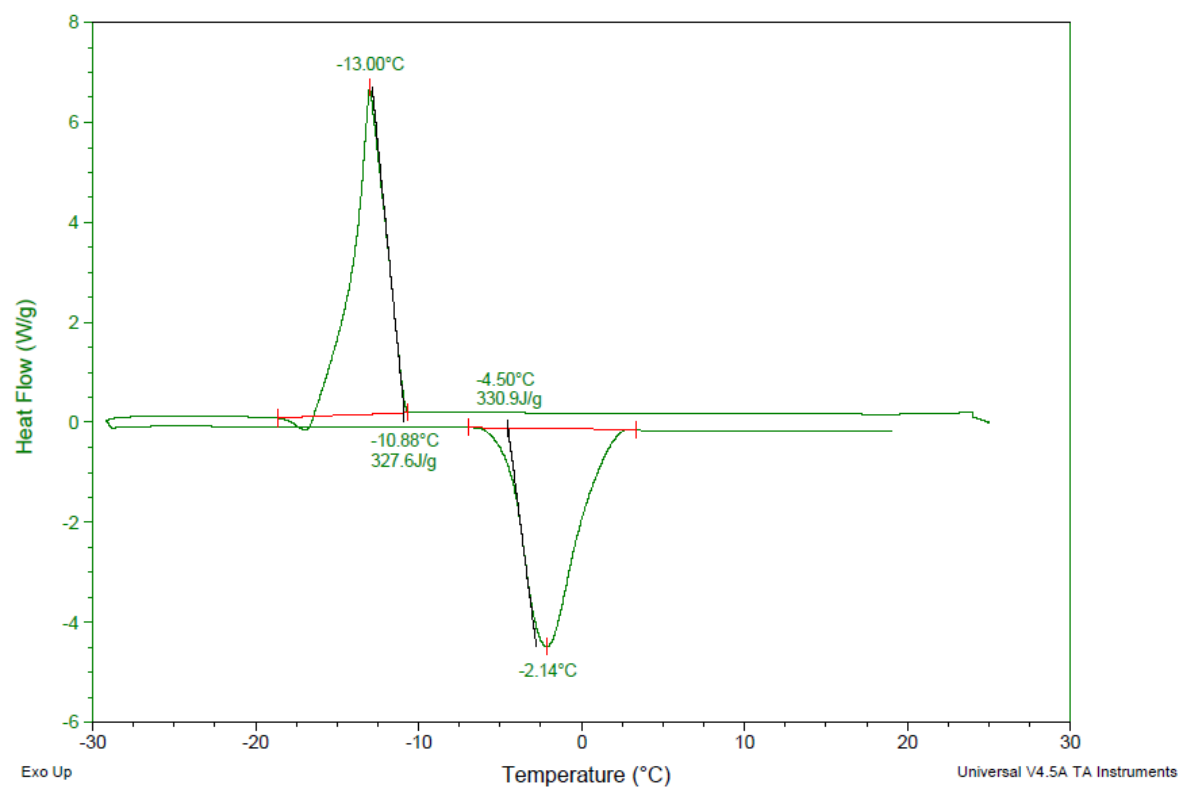
Příloha 29: DSC – HK PP ihned po smíchání s vodou



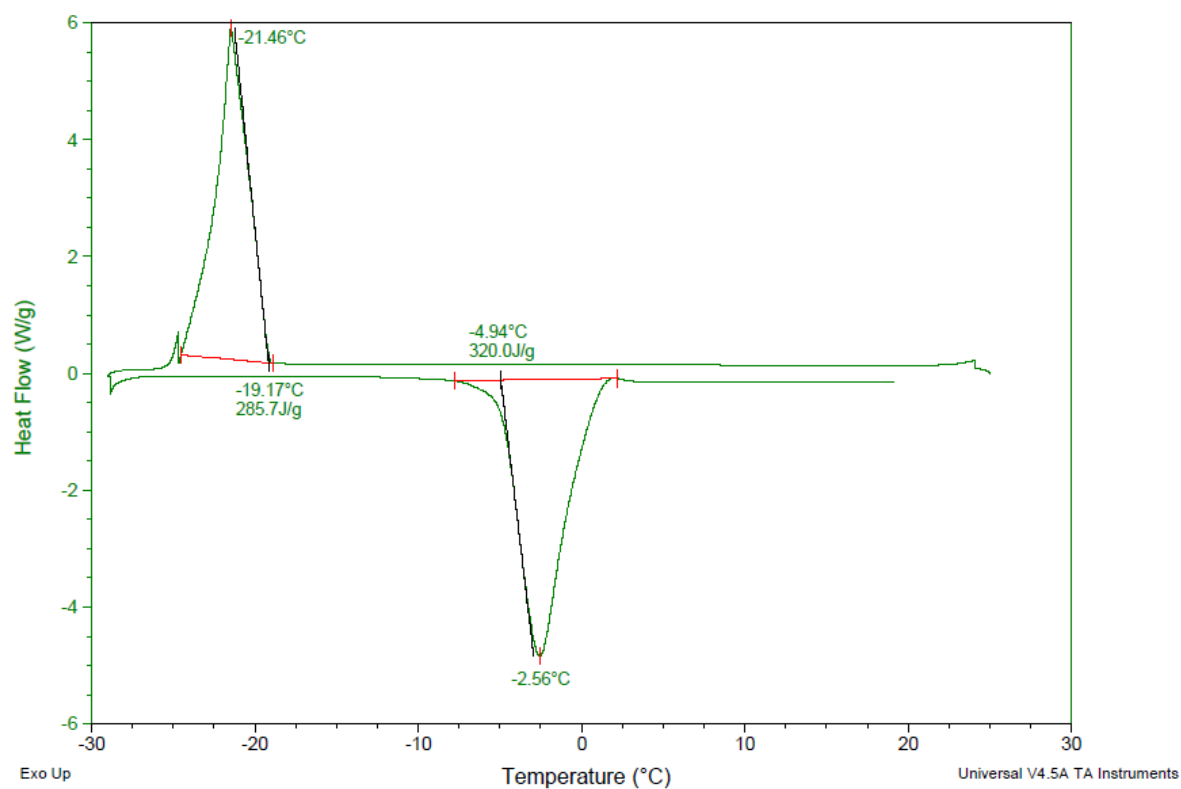
Příloha 30: DSC – HK PP po 24 hodinách



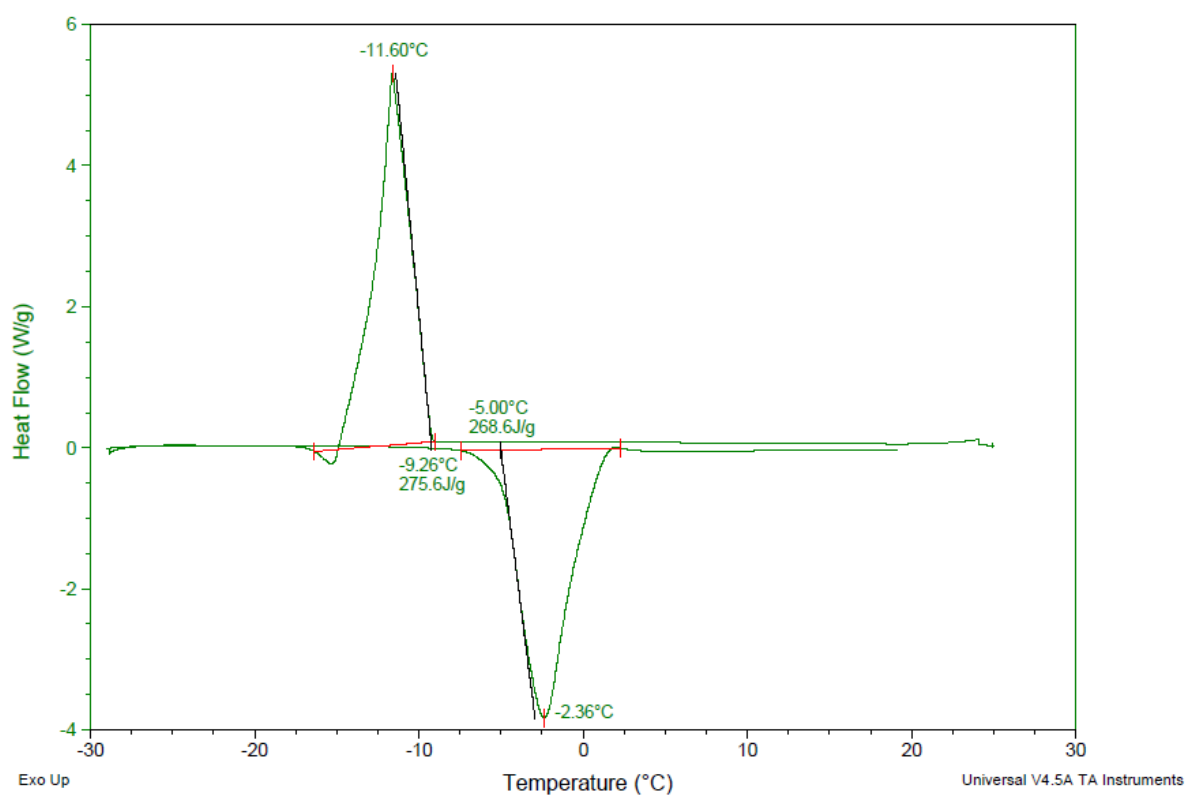
Příloha 31: DSC – HK SR ihned po smíchání s vodou



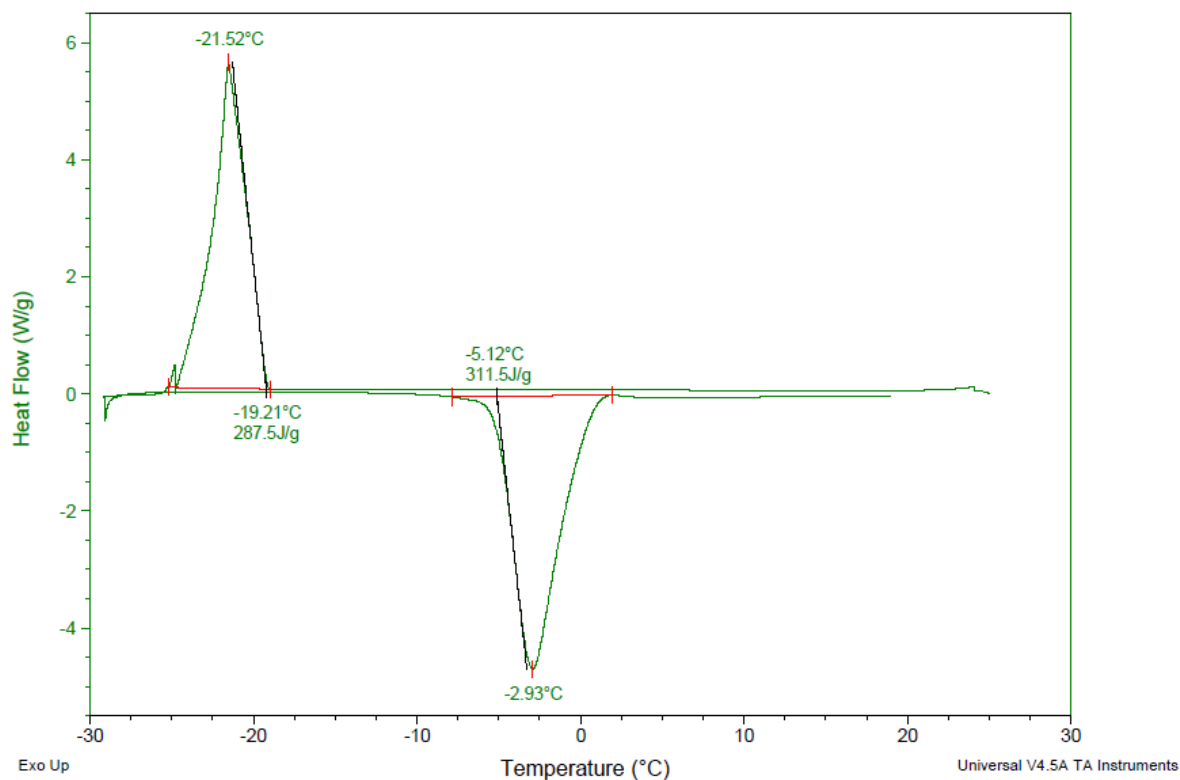
Příloha 32: DSC – HK SR po 24 hodinách



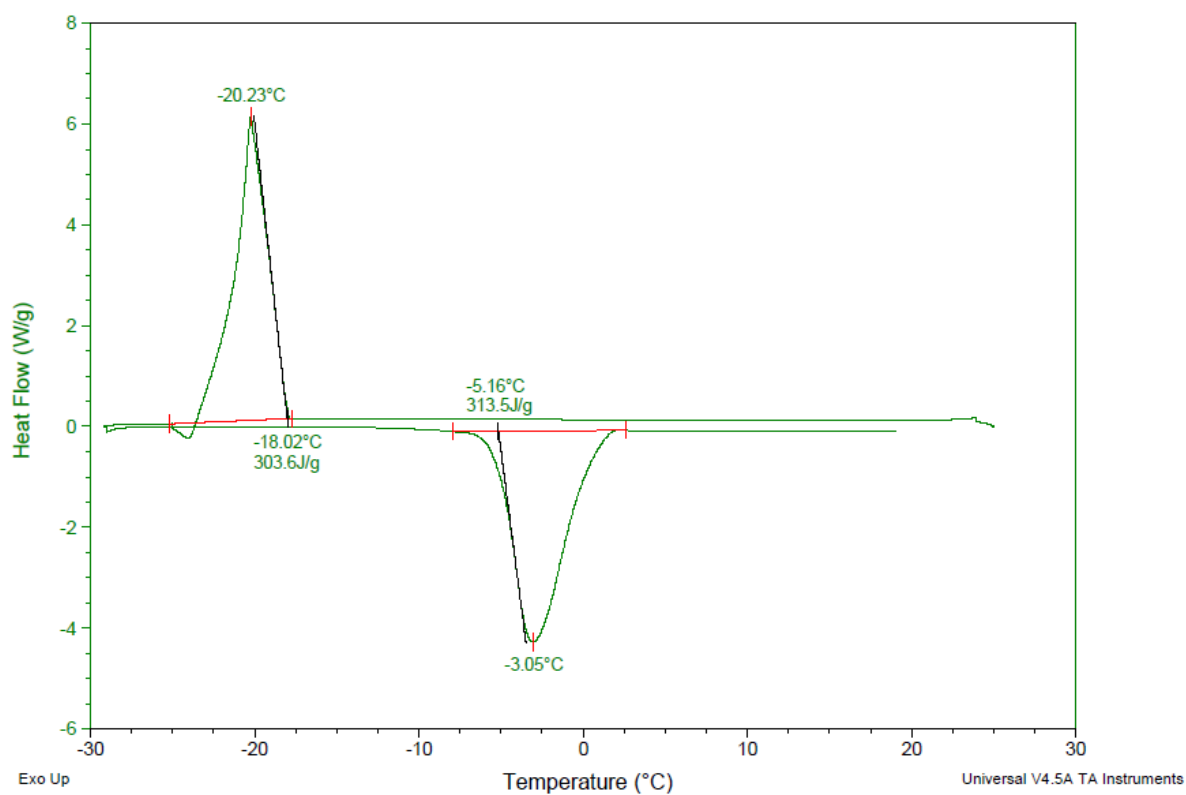
Příloha 33: DSC – HYLAL 500 – 750 ihned po smíchání s vodou



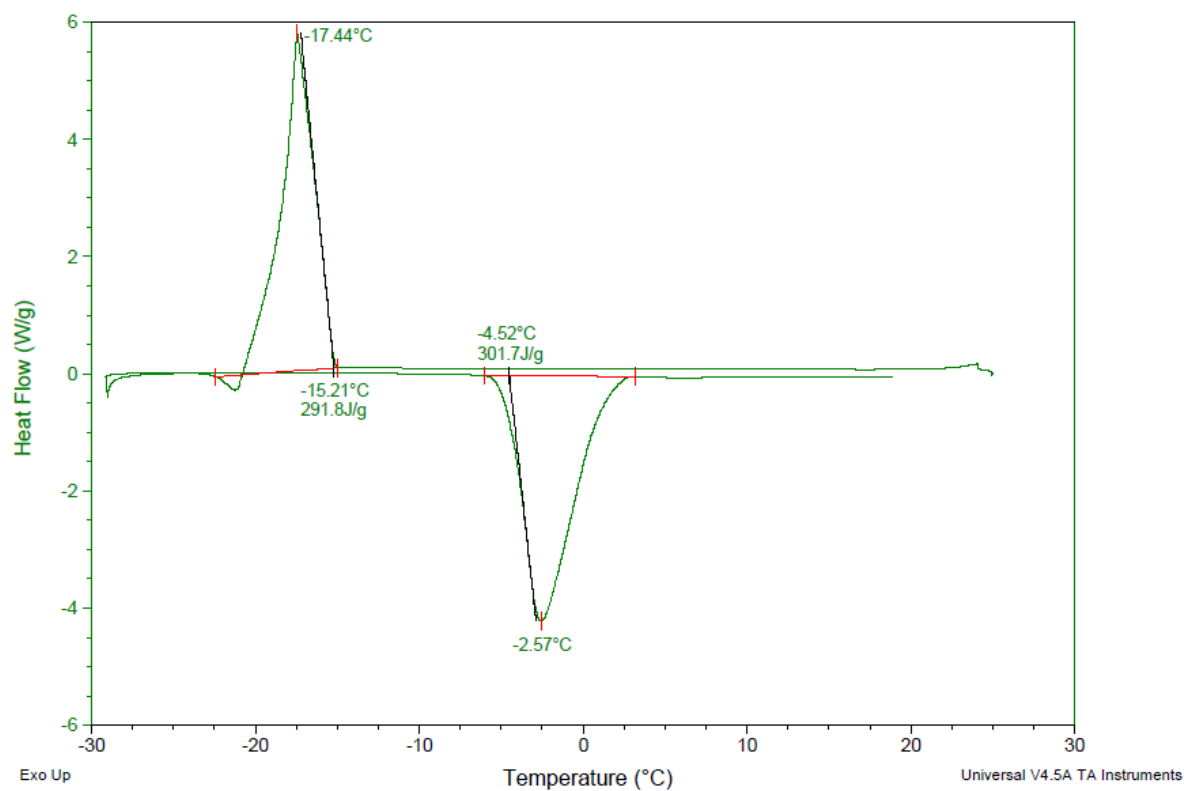
Příloha 34: DSC – HYLAL 500 – 750 po 24 hodinách



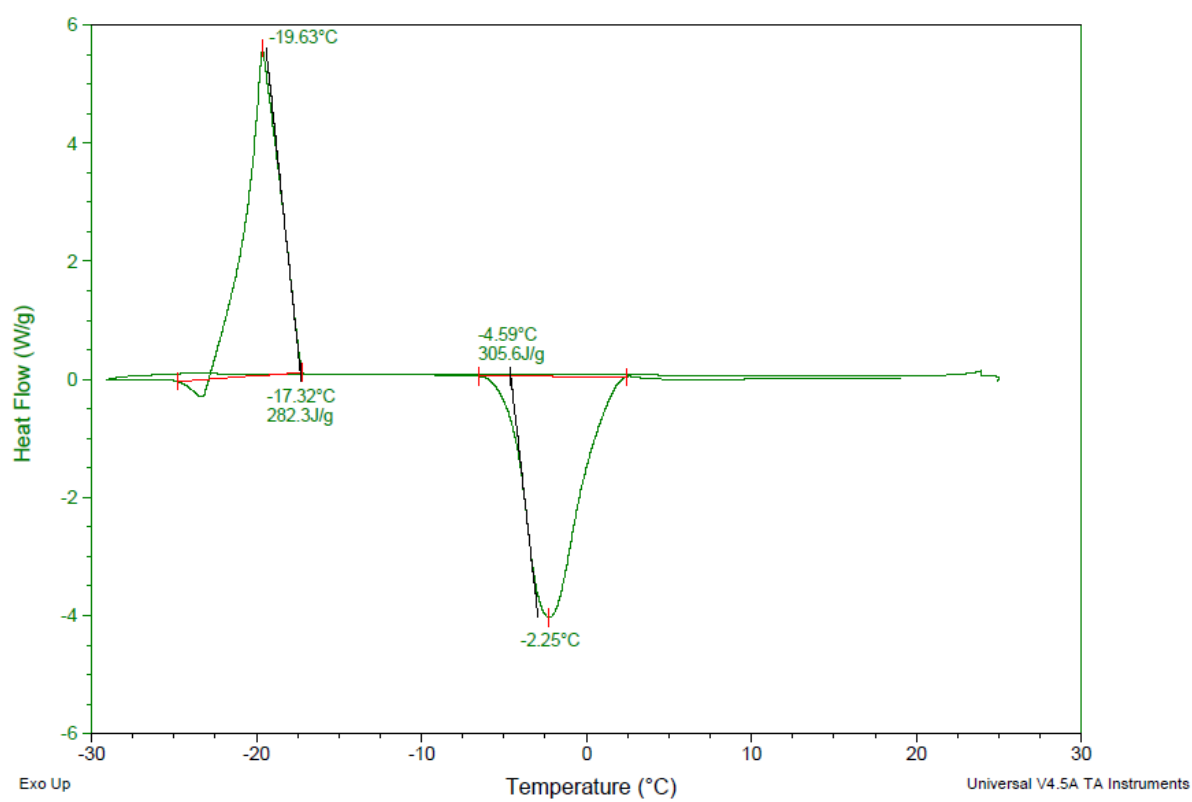
Příloha 35: DSC – HYL 1500 – 1750 ihned po smíchání s vodou



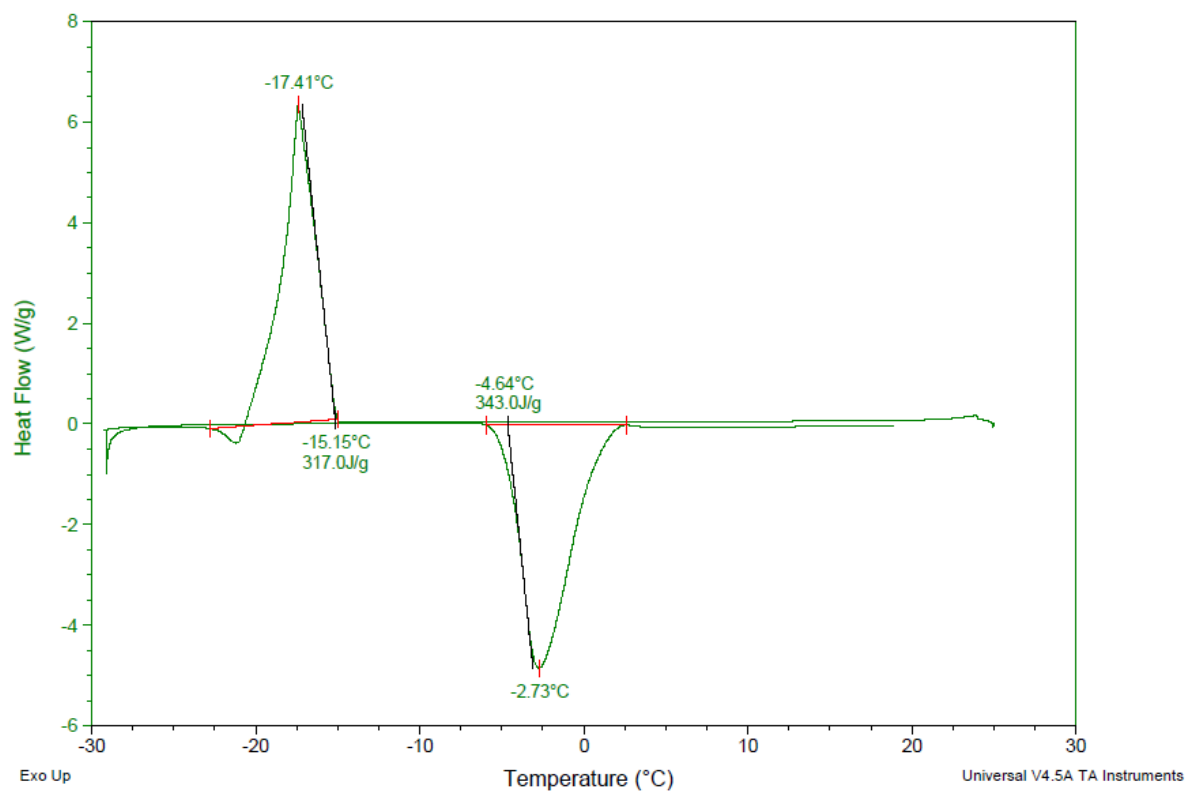
Příloha 36: DSC – HYL 1 500 – 1 750 po 24 hodinách



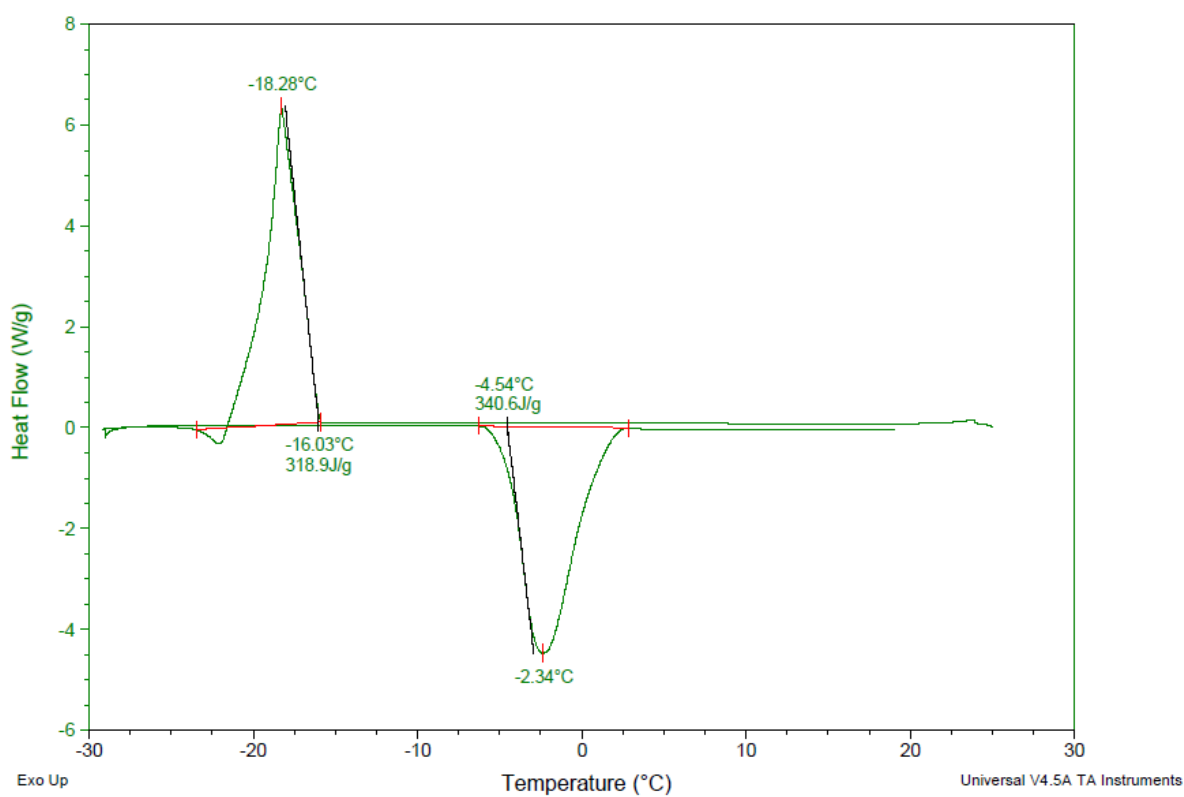
Příloha 37: DSC – dextran ihned po smíchání s vodou



Příloha 38: DSC – dextran po 24 hodinách



Příloha 39: DSC – chitosan ihned po smíchání s vodou



Příloha 40: DSC – chitosan po 24 hodinách